



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

**Struktur und Funktion von Proteasen und
Proteaseinhibitoren des Transglutaminaseproduzenten
*Streptomyces mobaraensis***

**vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation
von Norbert Egon Jüttner**

Erstgutachterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer

Darmstadt 2019

Jüttner, Norbert Egon: Struktur und Funktion von Proteasen und Proteaseinhibitoren des Transglutaminaseproduzenten *Streptomyces mobaraensis*

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung auf TUpriints: 2019

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-81465

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2019

Veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 International

Publikationen

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Juettner, N. E.*, Schmelz, S.*, Bogen, J. P., Happel, D., Fessner, W. D., Pfeifer, F., Fuchsbauer, H.-L., Scrima, A. (2018)

Illuminating structure and acyl donor sites of a physiological transglutaminase substrate from *Streptomyces mobaraensis*.

Protein Science, DOI: 10.1002/pro.3388

Juettner, N. E., Classen, M., Colin, F., Hoffmann, S. B., Meyners, C., Pfeifer, F., Fuchsbauer, H.-L. (2018)

Features of the transglutaminase-activating metalloprotease from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847 produced in *Escherichia coli*.

Journal of Biotechnology, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.004

Juettner, N. E.*, Schmelz, S.*, Kraemer A., Knapp, S., Becker, B. , Kolmar, H., Scrima A., Fuchsbauer, H.-L. (2018)

Structure of a glutamine donor mimicking inhibitory peptide shaped by the catalytic cleft of microbial transglutaminase.

The FEBS Journal, DOI: 10.1111/febs.14678

Publikation zu einem anderen Thema während der Doktorarbeit:

Zindel, S., Ehret, V., Ehret, M., Hentschel, M., Witt, S., Krämer, A., Fiebig, D., Jüttner, N., Fröls, S., Pfeifer, F., Fuchsbauer, H.-L. (2016)

Involvement of a Novel Class C Beta-Lactamase in the Transglutaminase Mediated Cross-Linking Cascade of *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847.

PLoS One, DOI: 10.1371/journal.pone.0149145

*geteilte Erstautorschaft

„Ideen, wie absolute Gewissheit, absolute Genauigkeit, endgültige Wahrheit und so fort, sind Erfindungen der Einbildungskraft und haben in der Wissenschaft nichts zu suchen.“

Max Born
(1882 – 1970)

Abstract

The major objectives of the present work were the functional and structural characterization of the *Streptomyces* subtilisin and TAMP inhibitor (SSTI) and the *Streptomyces* papain inhibitor (SPI) from *Streptomyces mobaraensis*. Previous studies identified both proteins as protease inhibitors and substrates of the cross-linking enzyme transglutaminase. In the present work, structural characterization of both proteins was performed by X-ray crystallography, site-directed mutagenesis, kinetic as well as protein interaction studies. The obtained information was used to elucidate the respective mechanism of inhibition and the interaction of the inhibitory proteins with the bacterial transglutaminase in order to get a deeper insight into the role of the secreted protease inhibitors and transglutaminase in the life cycle of *S. mobaraensis*.

To characterize SSTI, the recombinant production of the transglutaminase-activating metalloprotease (TAMP) was first established using *E. coli*. Isothermal titration studies demonstrated the high catalytic efficiency of the metalloprotease towards transglutaminase and its enthalpy-driven inhibition by the intrinsically inhibitory protein SSTI. Mutagenesis studies with SSTI refuted previous findings that the subtilisin and TAMP binding sites are located in the same protein loop. As predicted by sequence alignment, inhibition of subtilisin occurs in the loop region containing Met108. Moreover, the study clearly proved that TAMP was inhibited by a Leu-Tyr motif at the *N*-terminal peptide of SSTI. A Gln-Gln motif, upstream of the Leu-Tyr motif, was the glutamine donor site of SSTI as depicted by the MTG-mediated incorporation of biotin cadaverine. Thus, the collected data illustrated reverse effects on SSTI cross-linking and TAMP inhibition that are likely regulated by a prolyl tri/tetrapeptidyl aminopeptidase of *S. mobaraensis*.

Extensive studies on the papain inhibitor SPI confirmed the composition of a protein (SPI_p) and a small peptidic molecule being the inhibitory compound (SPI_{ac}). Upon elaborated separation procedures, structure of SPI_{ac} was determined by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. The isolated substance at least consisted of two peptidic aldehyde inhibitors that differ only in phenolic hydroxyl groups from chymostatin B. Characterization of the SPI_p revealed a thermo-resistant double psi-beta-barrel (DPBB) structure stabilized by two cysteine bridges. MTG-mediated incorporation of biotin cadaverine identified Gln6 as the only amine acceptor site of SPI_p. Furthermore, replacement of the adjacent lysine (Lys7) with glycine and alanine dramatically increased the labeling efficacy. Site-directed replacement of individual arginine residues on the SPI_p surface then failed to identify hot spots for the interaction with MTG. However, the crystal structure of MTG inhibited by a chloroacetylated inhibitor based on the *N*-terminal protein sequence of SPI_p surrounding Gln6, allowed insights into the interaction mechanism of MTG with intrinsic substrates. The peptide structure shaped by the catalytic cleft walls of MTG suggested a zipper-like cross-linking mechanism of self-assembled substrate proteins.

Zusammenfassung

Gegenstände der vorliegenden Arbeit waren der *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMP-Inhibitor (SSTI) und der *Streptomyces*-Papain-Inhibitor (SPI) von *Streptomyces mobaraensis*, deren Struktur und Funktion untersucht wurden. Beide Proteine stellten sich in früheren Studien als durch Transglutaminase vernetzbare Proteaseinhibitoren heraus. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der strukturellen Charakterisierung der Proteine durch Röntgenstrukturanalyse, Mutagenesestudien, bio- und physikochemischen Untersuchungen sowie Interaktionsanalysen. Die daraus gewonnenen Informationen sollten dazu dienen, den jeweiligen Inhibierungsmechanismus der Proteine und die Interaktion der inhibitorischen Proteine mit der bakteriellen Transglutaminase aufzuklären, um so die Rolle der sekretierten Proteaseinhibitoren sowie Transglutaminase im Lebenszyklus von *S. mobaraensis* besser zu verstehen.

Zur Charakterisierung des SSTI erfolgte zunächst die rekombinante Produktion des Interaktionspartners, der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease (TAMP), in *E. coli*. Untersuchungen mittels isothermaler Titration zeigten die hohe katalytische Effizienz der Metalloprotease gegenüber Transglutaminase und ihre Inhibierung durch das intrinsisch inhibitorische Protein SSTI als Enthalpie-getriebenen Prozess. Mutagenesestudien mit SSTI widerlegten bisherige Erkenntnisse, dass Subtilisin und TAMP an die gleiche Proteinschleife binden. Die Inhibierung des Subtilisin erfolgt, wie durch strukturelle Vergleiche vorhergesagt, in der *Loop*-Region des Met108. Darüber hinaus wurde jedoch zweifelsfrei bewiesen, dass die Inhibierung der TAMP am *N*-terminalen Peptid des SSTI durch ein Leu-Tyr-Motiv erfolgt. Über ein stromaufwärts des Leu-Tyr-Motiv lokalisiertes Gln-Gln-Motiv wird zudem die Vernetzung des SSTI mittels MTG ermöglicht. Die generierten Daten legen eine gegenläufige Regulation von SSTI-Vernetzung und TAMP-Inhibierung durch die bekannte Prolyl-tri/tetrapeptidyl-Aminopeptidase von *S. mobaraensis* nahe.

Umfangreiche Untersuchungen bezüglich des Papaininhibitors SPI bestätigten die Zusammensetzung aus einem Protein (SPI_p) und einem kleinen peptidischen Molekül, das die inhibitorisch wirksame Komponente (SPI_{ac}) darstellt. Bei SPI_{ac} handelt es sich um zwei peptidische Aldehydinhibitoren, die sich lediglich durch phenolische Hydroxylgruppen von Chymostatin B unterscheiden. Die Charakterisierung des SPI_p ergab eine thermoresistente *Double-Psi-Beta-Barrel*(DPBB)-Struktur, die durch zwei Cysteinbrücken stabilisiert wird. Der Einbau von Biotinylcadaverin durch MTG identifizierte Gln6 als die einzige Amin-Akzeptorstelle des SPI_p. Der Austausch des benachbarten Lysin (Lys7) gegen Glycin und Alanin erhöhte die Markierungsgeschwindigkeit um ein Vielfaches, während die ortsgerichtete Einführung einzelner Argininreste an der Proteinoberfläche keinen Hinweis auf die Interaktion mit Transglutaminase gab. Erst die Struktur eines chloracetylierten Inhibitors, abgeleitet aus dem Proteinsegment an der Glutaminbindestelle von SPI_p (Gln6), im katalytischen Spalt ermöglichte einen Einblick in die Interaktion von MTG mit intrinsischen Substraten. Das generierte Peptidmodell legt einen Reißverschluss-ähnlichen Vernetzungsmechanismus von selbstorganisierten Substratproteinen durch MTG nahe.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Streptomyceten	1
1.2. Bakterielle Transglutaminase	3
1.2.1. Vorkommen und Katalysemechanismus.....	3
1.2.2. Primärstruktur und Prozessierung der MTG von <i>S. mobaraensis</i>	5
1.2.3. Tertiärstruktur und Funktion der MTG von <i>S. mobaraensis</i>	7
1.2.4. Substratspezifität der mikrobiellen Transglutaminase	11
1.3. Intrinsische Transglutaminase-Substrate von <i>S. mobaraensis</i>	12
1.3.1. <i>Streptomyces</i> -Subtilisin- und TAMP-Inhibitor.....	13
1.3.2. Dispase Autolyse-induzierendes Protein von <i>S. mobaraensis</i>	14
1.3.3. <i>Streptomyces</i> -Papain-Inhibitor	16
1.4. Fragestellung und Zielsetzung.....	17
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Material.....	19
2.1.1. Mikroorganismen	19
2.1.2. Plasmide.....	19
2.1.3. Oligonukleotide (<i>Primer</i>).....	20
2.1.4. DNA und Protein Molekulargewichtsstandards	22
2.1.5. Enzyme und Proteine	23
2.1.6. Antikörper/Farbstoffkonjugate	23
2.1.7. Chemikalien	24
2.1.8. Säulenmaterialien/Säulen	25
2.1.9. Kits	25
2.1.10. Medien und Lösungen für mikro- und molekularbiologische Methoden	26
2.2. Mikrobiologische Methoden.....	28
2.2.1. Sterilisation	28
2.2.2. Bestimmung der Zelldichte.....	28
2.2.3. Kultivierung von <i>E. coli</i>	29
2.2.4. Zellernte und Zellaufschluss von <i>E. coli</i> für die rekombinante Produktion	29
2.2.5. Kultivierung von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	30
2.3. Molekularbiologische Methoden.....	30
2.3.1. Bestimmung der DNA-Konzentration.....	30
2.3.2. Agarose Gelelektrophorese.....	30
2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.3.4. DNA-Reinigung	31

2.3.5.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.3.6.	<i>Size-overlap-extension</i> -PCR	32
2.3.7.	DNA-Restriktion	33
2.3.8.	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.3.9.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.3.10.	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	34
2.3.11.	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	35
2.4.	Reinigung von Proteinen.....	35
2.4.1.	Fraktionierende Ethanol-Fällung.....	35
2.4.2.	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)	35
2.4.3.	Ionenaustauschchromatographie (IAC).....	36
2.4.4.	Gelpermeationschromatographie (GPC)	37
2.4.5.	Dialyse von Proteinlösungen	38
2.4.6.	Konzentrierung von Proteinlösungen.....	38
2.5.	Reinigung von SPI_{ac}.....	38
2.5.1.	Negative Kationen- und Anionenaustauschchromatographie von SPI _{ac}	38
2.5.2.	Hydrophobe Extraktion von SPI _{ac}	39
2.5.3.	Kationische Extraktion von SPI _{ac}	39
2.5.4.	Säulenchromatographie von SPI _{ac}	40
2.5.5.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	40
2.5.6.	Entfernung organischer Lösungsmittel	41
2.5.7.	Gefriertrocknung.....	41
2.6.	Analytische Methoden	42
2.6.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.6.2.	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.6.3.	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	43
2.6.4.	Zymographie.....	44
2.6.5.	Coomassie Färbung von SDS-Gelen.....	44
2.6.6.	Schmelzpunktbestimmung mittels intrinsischer Fluoreszenz	45
2.6.7.	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC).....	45
2.6.8.	Diskontinuierlicher Aktivitätstest für TGasen: Hydroxamsäure-Assay.....	47
2.6.9.	Kontinuierlicher Aktivitätstest für TGasen: Dimethylcasein-Assay	48
2.6.10.	Diskontinuierlicher Aktivitätstest für Cysteinproteasen: para-Nitroanilid-Assay.....	48
2.6.11.	Kontinuierlicher Aktivitätstest für Cysteinproteasen: Aminomethylcoumarin-Assay	49
2.6.12.	Aktivitätstest für P1'- Endoproteasen: <i>Dabcyl-Edans</i> -Assay.....	50
2.6.13.	Allgemeiner Proteaseaktivitätstest: Modifizierter Anson-Assay	51

2.6.14.	MTG katalysierte Biotinylierung	51
2.6.15.	Protein- <i>Blotting</i>	52
2.6.16.	Immunochemische Färbung von Protein <i>blots</i>	53
2.6.17.	Proteinkristallisation	54
2.6.18.	HPLC Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie	54
2.6.19.	Maldi TOF/ <i>N</i> -terminale Sequenzierung	54
2.6.20.	MS-MS-Analytik inhibitorischer Peptide	55
2.6.21.	NMR-Analytik inhibitorischer Peptide	55
2.7.	Festphasenpeptidsynthese der Inhibitorpeptide IP1, IP2 und IP3	55
3.	Ergebnisse.....	57
3.1.	Gentechnische Arbeiten	57
3.2.	Rekombinante Transglutaminase aktivierende Metalloprotease (<i>rTAMP</i>).....	59
3.2.1.	Reinigung von <i>rTAMP</i>	59
3.2.2.	Primärsequenz der <i>rTAMP</i>	62
3.2.3.	Aktivität und Stabilität der <i>rTAMP</i>	64
3.2.4.	Affinität von <i>rTAMP</i> zu <i>rproMTG</i>	66
3.3.	Rekombinanter <i>Streptomyces</i> Subtilisin und TAMP Inhibitor (<i>rTAMP</i>).....	68
3.3.1.	Reinigung von <i>rSSTI</i>	68
3.3.2.	Komplexierungsverhalten von <i>rSSTI</i> und <i>rTAMP</i>	71
3.3.3.	Bioinformatische Analyse des <i>SSTI</i>	73
3.3.4.	Bestimmung der TAMP-Inhibierungsstelle am <i>SSTI</i>	74
3.3.5.	Glutaminbindestelle von <i>SSTI</i> für MTG	78
3.4.	<i>Streptomyces</i> Papain Inhibitor (<i>SPI</i>)	79
3.4.1.	<i>SPI</i> aus <i>S. mobaraensis</i>	79
3.4.2.	Reinigung von <i>SPI_{ac}</i>	82
3.4.3.	Strukturaufklärung und biochemische Charakterisierung des <i>SPI_{ac}</i>	89
3.4.4.	Reinigung des rekombinanten <i>SPI_p</i>	102
3.4.5.	Strukturaufklärung des <i>SPI_p</i>	104
3.4.6.	Charakterisierung des <i>SPI_p</i> als MTG-Substrat	108
3.4.7.	Interaktion der MTG mit Inhibitorpeptiden abgeleitet aus MTG-Substratproteinen	116
4.	Diskussion.....	126
4.1.	Transglutaminase aktivierende Metalloprotease.....	126
4.2.	<i>Streptomyces</i> Subtilisin- und TAMP-Inhibitor	129
4.3.	<i>Streptomyces</i>-Papaininhibitor	132
4.3.1.	<i>SPI_{ac}</i>	132
4.3.2.	<i>SPI_p</i> -Struktur.....	135

4.3.3. Charakterisierung der SPI _p -MTG Interaktion.....	136
5. Literaturverzeichnis	141
6. Anhang	156
6.1. Zusätzliche Abbildungen.....	156
6.2. Abbildungsverzeichnis	157
6.3. Tabellenverzeichnis	159
6.4. Abkürzungsverzeichnis	160
7. Danksagung.....	162
8. Ehrenwörtliche Erklärung.....	164
9. Lebenslauf.....	165
10. Daten DVD.....	167

1. Einleitung

1.1. Streptomyceten

Bei Mikroorganismen der Gattung *Streptomyces* handelt es sich um Gram-positive, filamentöse und ubiquitär vorkommende Bodenbakterien, die zu den heterogenen Actinomyceten gehören [1]. Sie zählen weiterhin zu den aeroben und chemoorganotrophen Eubakterien mit einem ungewöhnlich hohen GC-Gehalt von durchschnittlich 74 Prozent [2]. In der Gattung *Streptomyces* sind bisher über 500 Arten und Unterarten beschrieben. Sie verfügt somit über die größte Artenvielfalt in der Domäne Bacteria [3].

Actinomyceten nutzen eine außergewöhnlich große Vielzahl an extrazellulären Funktionen für ihr Wachstum, das komplexe Entwicklungsstadien umfasst und von anderen Mikroorganismen im gleichen Habitat beeinflusst wird [4]. Seit der Entdeckung von Streptomycin als erstes therapeutisch nutzbares Antibiotikum im Jahre 1943 hat sich herausgestellt, dass Streptomyceten chemisch unterschiedliche Inhibitoren in großer Vielfalt für verschiedenste zelluläre Prozesse synthetisieren. Darunter finden sich Antibiotika, Fungizide, Zytostatika, Modulatoren der Immunantwort sowie Effektoren des Pflanzenwachstums [5]. Streptomyceten spielen eine Schlüsselrolle in der Bodenökologie aufgrund ihrer Fähigkeit, Nährstoffe zu gewinnen und eine Großzahl von Polysacchariden wie Cellulose, Chitin, Xylan und Agar sowie andere natürliche Makromoleküle zu hydrolysieren [4].

Der Lebenszyklus der Streptomyceten beginnt mit der Keimung von Sporen, welche bipolar Keimschläuche ausbilden. Daraus entsteht durch Verlängerung und Verästelung ein kompliziert verzweigtes Mycel, das sogenannte Substratmycel [6]. Im Gegensatz zu einzelligen Bakterien wie *E. coli* und *B. subtilis*, bei denen die Zellelongation/Zellausdehnung durch Einlagerung von neuem Zellwandmaterial in der lateralen Wand erfolgt, wachsen die vegetativen Hyphen der multizellulären Streptomyceten durch Spitzenverlängerung und -verzweigung [7]. Die Zellunterteilung der Hyphen während des vegetativen Wachstums führt durch den Einzug von Querwänden zur Ausbildung von miteinander verbundenen Kompartimenten und nicht zur Zellabspaltung [8]. Jedes dieser Kompartimente enthält dabei zahlreiche Kopien des vollständigen Chromosoms [9, 10]. Der Abstand zwischen den vegetativen Querwänden variiert signifikant und hängt von der Art, den Wachstumsbedingungen und dem Alter des Mycels ab. Unter widrigen Lebensumständen wie Nährstoffmangel differenziert das vegetative Mycel, um sporogene Organe auszubilden, die sog. Lufthyphen. Zu diesem Zeitpunkt werden die meisten antibiotisch wirksamen Substanzen produziert [11, 12]. Das vegetative bzw. Substratmycel wird dabei als Nährstoffspeicher genutzt und abgebaut. Der Ablauf ähnelt dem programmierten Zelltod (PZT) und stellt die notwendige Nährstoffversorgung für den Aufbau des Luftmycels sicher [13, 14]. Der Abbau von DNA und Proteinen durch Nukleasen und Proteasen führt zur Akkumulation von Aminosäuren, Aminosackern, Nukleotiden und Fetten im Bereich des sich auflösenden Mycels [15, 16]. Diese Anhäufung von Nährstoffen lockt mobile Nahrungskonkurrenten

an, sodass die Produktion von antibiotischen Substanzen notwendig ist, um die freigesetzten Nährstoffe zu schützen. Den programmierten Zelltod beschreibt das gut untersuchte DasR-System. DasR ist ein nährstoffsensitiver Regulator, welcher die Frühphasenentwicklung und die Produktion von Antibiotika reguliert und auf die Akkumulation von *N*-Acetylglucosamin reagiert [16, 17]. In ihrem Lebenszyklus durchlaufen Streptomyceten zweimal einen Apoptose-ähnlichen Mechanismus [18]. Nach der Sporenkeimung entwickelt sich das kompartmentierte Mycel (MI_{12h}) bis zur ersten streng geordneten Absterbephase. Das MI differenziert zu einem mehrkernigen Mycel (MII_{24h}), welches mit der Expression der Chaplin- und Rodlin-Gene für den Aufbau der sogenannten Rodlet-Schicht beginnt. Diese äußere Proteinschicht ermöglicht durch ihre Hydrophobizität das Wachstum des Luftmycels (MII_{72h}). Am Ende des Zyklus steht dann die Sporulation. Das MI stellt die vegetative Entwicklungsstufe des Streptomyceten dar, das späte MII hingegen die reproduktive Phase mit ihrer Sporenbildung (Abbildung 1) [18].

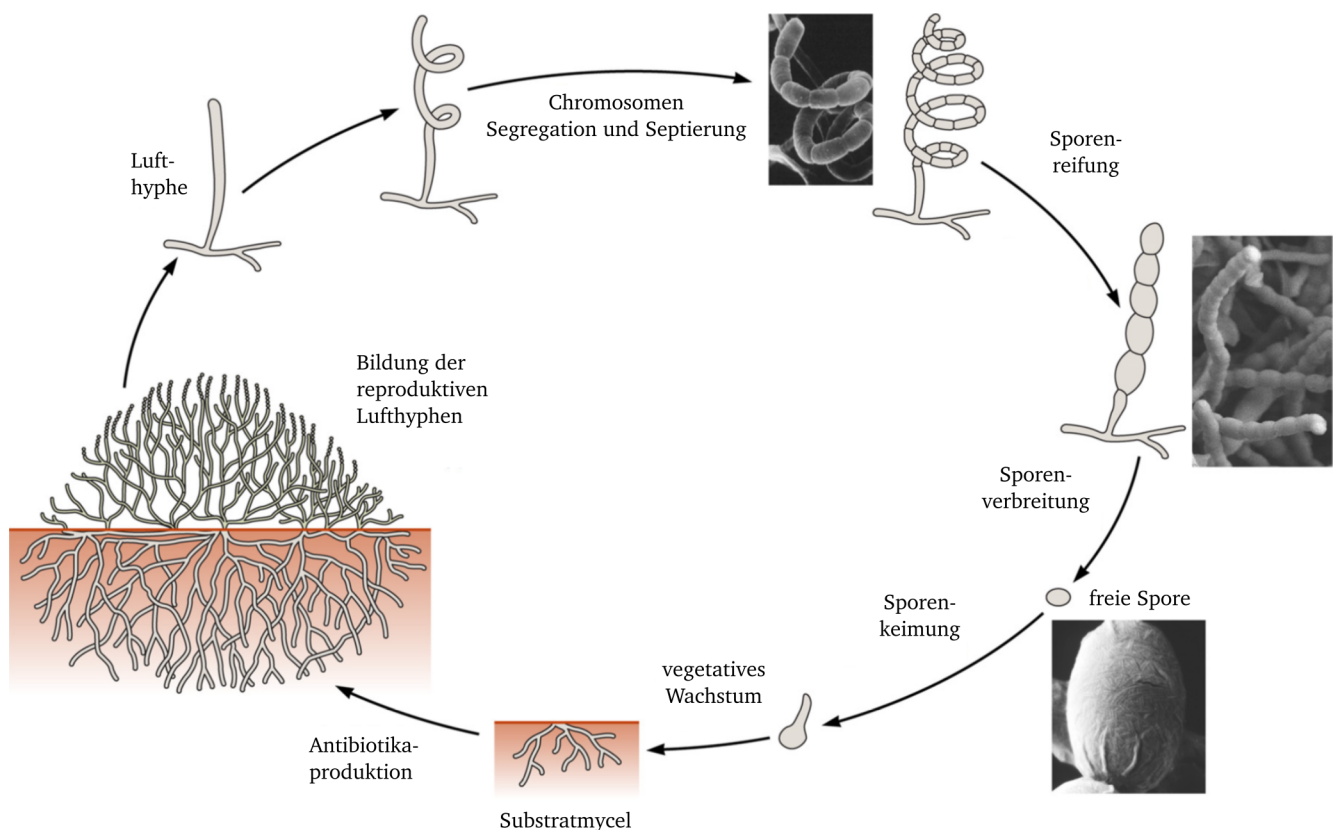


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sporulation und des Lebenszyklus von Actinomyceten.
Die Abbildung wurde Barka *et al.* [19] entnommen und modifiziert.

In Submerskultur weisen Streptomyceten ein leicht abgewandeltes Wachstum auf. Das vegetative Substratmycel entsteht sowohl bei der Kultivierung auf festen Nährmedien als auch in Flüssigkultur [20, 21]. In Submerskulturen kommt es jedoch bei den meisten Streptomyceten zu keiner Lufthyphenbildung, sodass sich nur ein Substratmycel ausbildet, welches in Form sphärischer

Mikrokolonien wächst [22]. Aber auch ohne die Ausbildung des Luftmycels ist bei einigen Stämmen eine Sporulation im Flüssigmedium zu beobachten [23-25].

Aufgrund morphologischer und biochemischer Unterschiede der Sporophoren und reifen Sporen unterteilte Baldicci 1958 die Familie Streptomycetaceae in die Gattungen *Streptomyces* und *Streptoverticillium* [26]. *Streptoverticillien* weisen im Gegensatz zu Streptomyceten markante, wirtelartig verzweigte Sporophoren auf. Aufgrund von 16S rRNA-Analysen erfolgte 1990 wiederum die Eingliederung der *Streptoverticillien* in die Gattung *Streptomyces* durch Witt und Stackebrandt [27].

Der am besten charakterisierte Vertreter der Actinomyceten ist *S. coelicolor* A3(2), dessen Genom im Jahr 2002 vollständig sequenziert wurde [28]. Das ca. 8.7 Mbp große lineare Chromosom beinhaltet 7825 Protein-codierende Gene, und übertrifft damit *Saccharomyces cerevisiae* in der Anzahl der codierenden Gene deutlich [29]. Weitere wissenschaftlich relevante Streptomyceten sind z. B. *S. griseus*, *S. lividans*, *S. avermitilis* und *S. lavendulae*.

Das in dieser Arbeit verwendete Bakterium *S. mobaraensis* gehört zur ehemaligen Gattung *Streptoverticillium* und unterscheidet sich von den oben genannten Arten unter anderem durch die Bildung des Enzyms Transglutaminase. 2013 erfolgte gleichzeitig durch eine chinesische Forschergruppe und im Rahmen der Doktorarbeit von Stephan Zindel in der Arbeitsgruppe Fuchsbauer die Sequenzierung des ca. 8 Mbp großen Genoms von *S. mobaraensis* [30, 31]. Die Genom-Daten ermöglichen einen präzisen Einblick in die durch *S. mobaraensis* produzierten Proteine sowie die rekombinante Produktion und Charakterisierung relevanter Proteine im Rahmen dieser Arbeit.

1.2. Bakterielle Transglutaminase

1.2.1. Vorkommen und Katalysemechanismus

Transglutaminasen (Protein-Glutamin:Amin γ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) gehören zu der Enzymklasse der Transferasen. Sie katalysieren die Ausbildung von Isopeptidbindungen zwischen der γ -Carboxyamidgruppe proteingebundener Glutaminreste (Donor) und der primären ϵ -Aminogruppe verschiedener Verbindungen, wie zum Beispiel Protein-gebundener Lysine (Akzeptor). In Abwesenheit primärer Amine reagiert Wasser als Acyl-Akzeptor. Dies führt zur Deamidierung der Glutaminreste (Abbildung 2).

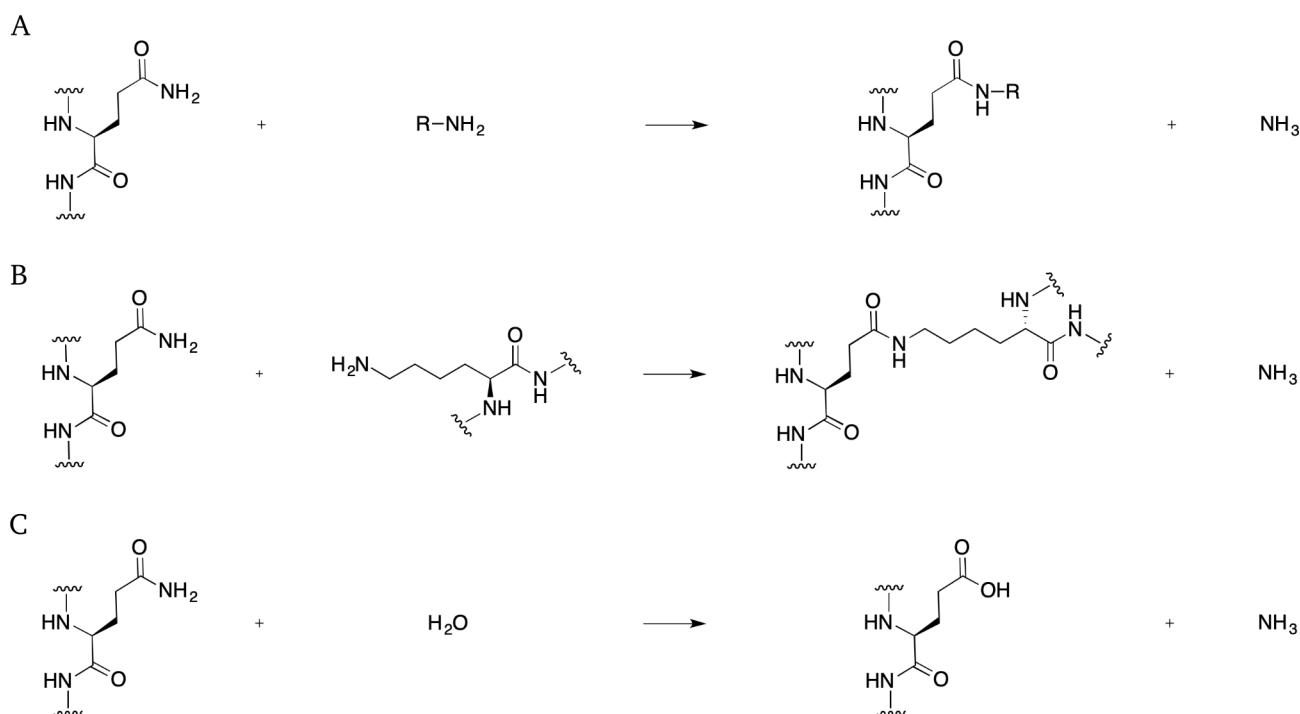


Abbildung 2: Transglutaminase katalysierte Reaktionen.

A) Acyltransfer-Reaktion: Reaktion der γ -Carboxamid-Gruppe peptid- oder proteingebundener Glutamine mit primären Aminen. B) Proteinvernetzung: die ϵ -Aminogruppe proteingebundener Lysine agiert als Acyl-Donor. C) Deamidierung: unter Abwesenheit von primären Aminen kann Wasser als Acyl-Akzeptor wirken [32]. Diese Abbildung wurde von Martins *et al.* [33] übernommen, modifiziert und mit Chemdraw 15.0 erstellt.

Transglutaminasen bilden eine ubiquitär vorkommende Enzymfamilie, da sie in Archaeen, Bakterien und Eukaryonten vorkommen [34]. Sie sind unter anderem für die posttranslationalen Modifikationen vieler Proteinen durch Ausbildung inter- und/oder intramolekularer Verbindungen zwischen Glutaminen und Lysinen unter Ausbildung von γ -Glutaminy- ϵ -Lysin-Isopeptidbindungen verantwortlich. Diese Modifizierungen können sich auf die Proteinkonformation auswirken oder führen zu hoch molekularen Proteinkonjugaten [35]. In mehrzelligen Organismen führen die durch Transglutaminasen erzeugten Isopeptidbindungen zu Festigkeit in Geweben und erhöhen ihre Widerstandskraft gegenüber Degradation [36]. In höheren Lebewesen spielt Transglutaminase, durch selektive Quervernetzung von Proteinen, eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen: Die humane Transglutaminase Faktor XIIIa stabilisiert das unlösliche Fibrinnetz bei der Blutgerinnung. Keratinozyten-Transglutaminase und epidermale Transglutaminase vernetzen Proteine im äußeren Plattenepithel der Haut [37]. Die humane Gewebetransglutaminase ist an der Bildung der extrazellulären Matrix beteiligt, fördert die Zelladhäsion und -mobilität und verursacht das Krankheitsbild der Zöliakie [38-42].

Im Gegensatz zu Transglutaminasen aus Arthropoden, Invertebraten, Pflanzen und Säugetieren benötigen bakterielle Transglutaminasen keine Calciumionen für die Bildung von Isopeptidbindungen und weisen eine breitere Substratspezifität sowie eine geringere Deamidierungsaktivität auf [43-50].

Die meisten mikrobiellen Transglutaminasen der Domäne Archaea und Bacteria wurden bisher nur durch Genomanalysen identifiziert. Neben einer charakterisierten, intrazellulären TGase von *Bacillus subtilis*, die in der späten Phase der Sporenreifung gebildet wird und an der Bildung der äußeren Sporenhülle beteiligt sein soll, wurden bisher hauptsächlich bakterielle Transglutaminasen von *Streptoverticillien* isoliert und charakterisiert [51-54]. Für die in dieser Arbeit verwendeten MTG aus *Streptomyces mobaraensis* (MTG, P81453) wurde ein Modell postuliert, nach dem die produzierte MTG während der Entwicklung der Lufthyphen und Sporen Inhibitorproteine quervernetzt. Dieses Postulat schlägt eine antibakterielle Schutzschicht vor, die den Wirt vor Proteasen konkurrierender Mikroorganismen schützt [55].

Aufgrund der Primärsequenz lässt sich diese *Streptoverticillien*-TGase in keine bisher bekannte Enzymfamilie eingliedern. Die Gemeinsamkeit mit anderen Transglutaminasen beschränkt sich auf die im aktiven Zentrum befindlichen, essentiellen Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat [50] und auf die Fähigkeit, Proteine durch Bildung einer ϵ -(γ -Glutamyl)lysin-Isopeptidbindung zu vernetzen [56].

1.2.2. Primärstruktur und Prozessierung der MTG von *S. mobaraensis*

Für die mikrobielle Transglutaminase aus *S. mobaraensis* gelang 1993 die Entschlüsselung der Aminosäuresequenz der 331 AS langen Polypeptidkette durch gezielte Fragmentierung und Edman-Analyse der Fragmente [57]. Amplifikation des TGase-Gens 1994 führte zur Sequenz der codierenden DNA. Washizu *et al.* nahmen an, dass das Enzym ein sekretorisches Protein mit einem hydrophoben Signalpeptid von 18 AS, einem Propeptid von 57 AS und einem reifen Enzym von 331 AS ist. Als Prozessierungsstelle wurde nach Vergleichen mit dem N-Terminus der reifen MTG die Peptidbindung zwischen Pro75 und Asp76 vorhergesagt [58]. Nach der Isolierung und Charakterisierung des Proenzym aus dem Kulturmedium einer 1-2 Tage alten *S. mobaraensis*-Kultur durch Pasternack *et al.* ergab sich für das Prä- und Propeptid eine Länge von 31 bzw. 45 AS [59]. Dabei wurden in der von Washizu *et al.* bestimmten DNA-Sequenz für das Propeptid eine Rasterverschiebung nachgewiesen und korrigiert (Abbildung 3).

```
MRIRRRALVFATMSAVLCTAGFMPSAGEAAA DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASSAGPSFR
APDSDDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGC VGV TWVNS
GQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQREVASVMNRALENAHDESAY
LDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYALRNTPSFKERNNGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYGDP
DAFRPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESK
FRNWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGW
```

Abbildung 3: Darstellung der Primärstruktur der Präprotransglutaminase von *S. mobaraensis*.

Das Signalpeptid ist orange, das Propeptid gelb und das reife Enzym grün unterlegt. Die im aktiven Zentrum befindlichen essentiellen Aminosäuren Cys64, Asp255 und His276 sind in rotem Fettdruck hervorgehoben.

Der strukturelle Aufbau der MTG entspricht dem typischen Aufbau sekretorischer Proteine Gram-positiver Bakterien, die durch die Plasmamembran aus der Zelle transportiert werden [60]. N-terminal ist ein Signalpeptid lokalisiert, welches das Protein zum Sekretionsapparat (Sec-System) in der Plasmamembran dirigiert. Im Anschluss an die ATP-verbrauchende Sekretion erfolgt die Abspaltung des Peptides durch spezifische Signalpeptidasen [61, 62]. Signalpeptide besitzen charakteristischerweise einen basischen N-Terminus dem sich ein hydrophober Kern und eine Erkennungssequenz für spezifische Signalpeptidasen anschließt [63]. Bei sekretorischen Proteinen Gram-positiver Mikroorganismen befindet sich typischerweise ein Propeptid zwischen Signalpeptid und dem reifen Enzym. Propeptide können dabei sowohl N- als auch C-terminal sowie an beiden Termini auftreten [64-66]. Für Propeptide sind unterschiedliche Funktionen beschrieben. Sie können die Sekretionsgeschwindigkeit steigern, zum Schutz des reifen Enzym vor proteolytischen Abbau beitragen, das reife Protein in der Zellmembran verankern, als intramolekulares Chaperon bei der Faltung des reifen Enzyms dienen und/oder die Aktivität des reifen Enzyms zum Schutz des Organismus inhibieren [67-71]. Bei der MTG hat das Propeptid vermutlich zwei Hauptfunktionen. Es dient als Faltungshilfe bei der Bildung des reifen Enzyms und verhindert durch sterische Blockade des aktiven Zentrums eine frühzeitige Aktivierung des Enzyms [50]. Die Inhibierung des reifen Enzyms dient auch dem Schutz der Zelle vor unkontrollierter Quervernetzung intrazellulärer Proteine.

Die Aktivierung des Proenzym erfolgt bei *S. mobaraensis* durch Proteolyse mit Hilfe der endogenen TGase-aktivierenden Metalloprotease (TAMP, P83543). Die Identifizierung und erste Charakterisierung der TAMP erfolgte 2003 durch Zotzel *et al.* [72]. Die Zuordnung der TAMP zu der M4-Familie der Metalloproteasen, zu der auch Thermolysin aus *B. thermoproteolyticus* gehört, erfolgte anhand ihrer N-terminalen Sequenz [73]. Sie weist Sequenzhomologien zur zinkabhängigen Endoprotease SGMPII (SgmaA) von *S. griseus* auf, welche durch EDTA und spezifische Inhibitoren gehemmt wird [74, 75]. Einen engen Verwandtschaftsgrad beider Enzyme legt weiterhin ihre Hemmung durch SSI-ähnliche Inhibitoren nahe [76]. *S. griseus* produziert einen durch das Gen SgiA codierten *Streptomyces*-Subtilisin-Inhibitor (SSI) [77]. Auch *S. mobaraensis* produziert einen SSI-ähnlichen Inhibitor (SSTI, P83544), der sowohl Subtilisin-ähnliche Proteasen als auch die TAMP inhibiert. Untersuchungen legen nahe, dass die Interaktion von TAMP und SSTI eine wichtige Rolle in der Frühphasenentwicklung von *S. mobaraensis* spielt [72]. Die Aktivierung der proMTG erfolgt durch die TAMP-vermittelte Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Phe(-4) und Ser(-5), wobei das Tetrapeptid Phe-Arg-Ala-Pro (FRAP) am N-Terminus der reifen MTG verbleibt. Die so entstehende FRAP-MTG besitzt bereits volle katalytische Aktivität [72]. Die abschließende Prozessierung der MTG durch Abtrennung des Tetrapeptides zum reifen Enzym erfolgt *in vitro* durch eine Prolyl-tri/tetrapeptidyl-Aminopeptidase (PTP-SM, P83615) ohne Bildung eines Intermediates (Abbildung 4) [78].

Ein N-terminaler Sequenzabgleich bestätigte die enge Verwandtschaft zu Tripeptidyl-Aminopeptidasen anderer Streptomycetenarten [79].

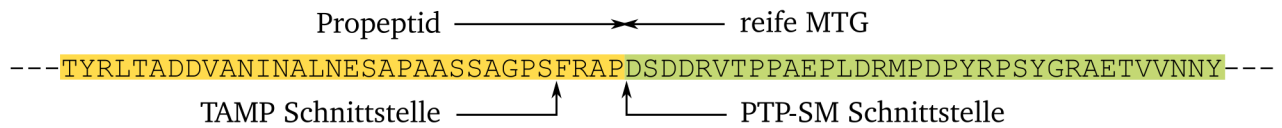


Abbildung 4: Die Aminosäuresequenz der MTG von *S. mobaraensis* an der Bindestelle von Proteasen.

Die Spaltstellen der TAMP und PTP-SM sowie die Peptidbindung zwischen dem Propeptid und dem reifen Enzym sind durch Pfeile gekennzeichnet [78]. Diese Abbildung wurde von Zotzel *et al.* [72, 78] übernommen und modifiziert.

Durch geringe Mengen an Calcium kann die Aktivität der PTP-SM stimuliert werden. Die ungewöhnlich hohe Spezifität der PTP-SM zur FRAP-MTG deutet darauf hin, dass die Funktion des Tetrapeptides darin besteht, die bereits aktivierte MTG zu regulieren (Abbildung 5). Es wird vermutet, dass das Tetrapeptid mit der negativ geladenen Mureinschicht ionisch interagiert und MTG auf diese Weise in der Zellwand zurückhält [78].

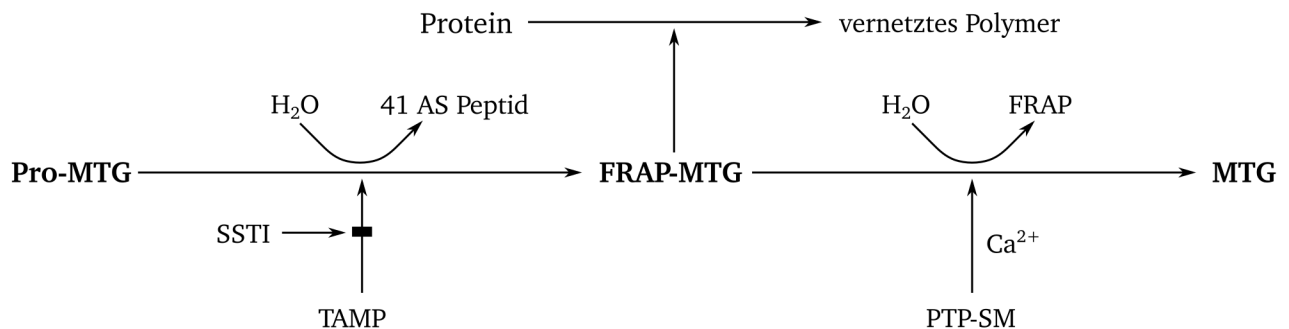


Abbildung 5: Prozessierung der Transglutaminase von *S. mobaraensis*.

ProMTG wird durch TAMP unter Freisetzung eines 41 AS großen Peptides aktiviert. SSTI kann diese Reaktion in equimolaren Verhältnissen inhibieren. Die entstehende FRAP-MTG weist bereits die volle Aktivität des reifen Enzyms auf. Die vollständige Prozessierung unter Abspaltung eines Tetrapeptides wird durch PTP-SM erreicht. Dieser Schritt wird durch geringe Konzentrationen an Ca^{2+} begünstigt [78]. Diese Abbildung wurde von Zotzel *et al.* [78] übernommen und modifiziert.

1.2.3. Tertiärstruktur und Funktion der MTG von *S. mobaraensis*

Durch Kashiwagi *et al.* erfolgte 2002 die Aufklärung der 3D-Struktur der MTG. Die Gesamtstruktur der MTG weist keinerlei signifikante Homologie zu Faktor-XIII-ähnlichen TGasen und Cysteinproteasen auf. Jedoch besitzt sie auf Sekundärstrukturebene im Bereich des aktiven Zentrums große Ähnlichkeit, was eine funktionelle Verwandtschaft dieser Enzyme impliziert [50].

MTG formt eine kompakte Proteindomäne in den Ausmaßen von $65 \times 59 \times 41 \text{ \AA}$, die ein zentrales 8-strängiges β -Faltblatt umgeben von 11 α -Helices beinhaltet und durch eine 16 \AA tiefe Spalte das diskusartige Protein kerbt. In dieser Spalte ist das aktive Zentrum lokalisiert, welches von zwei Loops gebildet wird und ein katalytisches Cystein beinhaltet. Diese beiden Ausstülpungen sind an ihren oberen Enden ca. 13 \AA voneinander entfernt. In diesen beiden Loops sorgen viele polare und hydrophobe Aminosäuren für eine stabile Struktur mit einem relativ niedrigen B-Faktor

(durchschnittlich 25.8 \AA^2). Der N-Terminus der MTG ragt in die Spalte des aktiven Zentrums. Wie zuvor beschrieben, wird die MTG durch das Bakterium als Zymogen produziert, dessen Propeptid eine helikale Struktur einnimmt und das aktive Zentrum bedeckt. Dieses Propeptid blockiert sterisch den Zugang für Substrate [80], ehe es durch Proteolyse und Dissoziation mit Hilfe von TAMP und PTP-SM abgespalten wird [72, 78].

Die α -Helices und β -Faltblattstränge treten konzentriert am N- und C-Terminus der Polypeptidkette auf. Während der Faltung ordnen sich diese so, dass der Kern aus β -Faltblattstrukturen von α -Helices umgeben ist, welche gehäuft in drei Regionen auftreten. Der zentrale β -Faltblattkern aber bildet eine 7-strängiges antiparalleles Strukturmuster aus (Abbildung 6) [50].

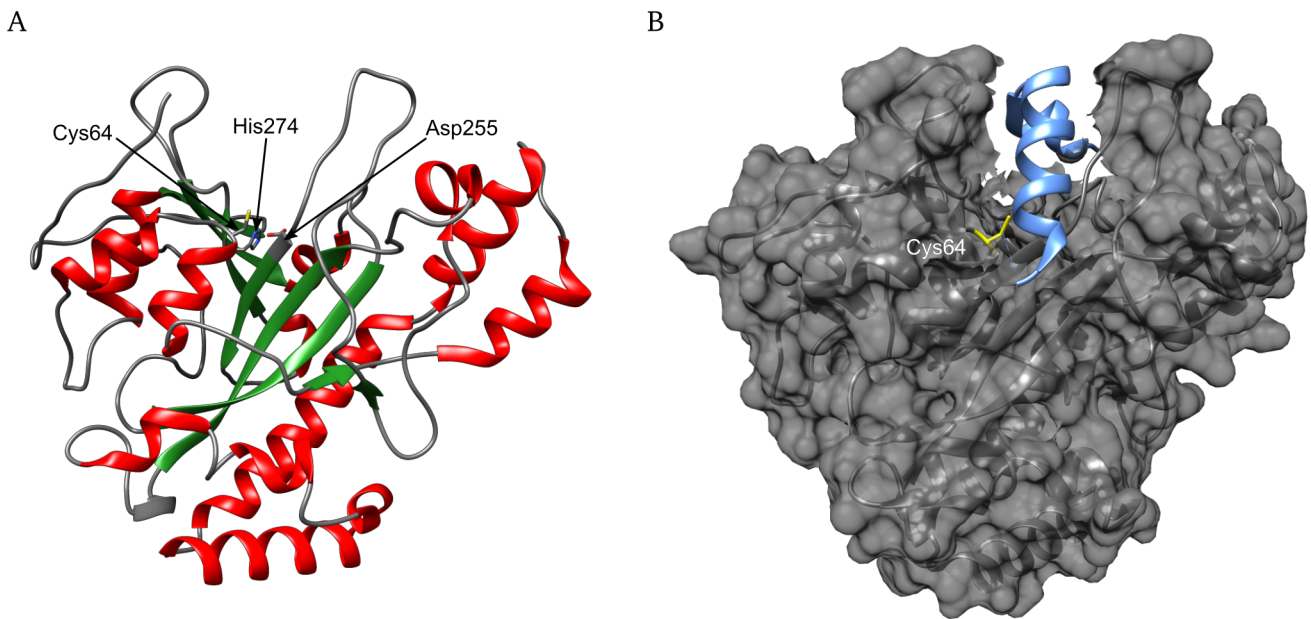


Abbildung 6: Kristallstruktur der mikrobiellen Transglutaminase (PDB: 3IUO).

A) Struktur der MTG in Cartoon Darstellung. Die α -helikalen Bereiche sind in rot und β -Faltblätter in grün dargestellt. Die katalytische Triade (Cys64, Asp255, His274) ist hervorgehoben. B) Oberflächendarstellung der MTG mit Propeptid. Das katalytische Cys64 (gelb) liegt im Tiefpunkt der das aktive Zentrum beinhaltenden Spalte. Das α -helikale Propeptid (blau) ermöglicht die richtige Faltung der MTG und blockiert das aktive Zentrum, um das Enzym nach der Synthese inaktiv zu halten [80]. Nach der Sekretion wird das Propeptid proteolytisch entfernt und das aktive Enzym freigesetzt. Diese Abbildung wurde von Strop [81] übernommen, modifiziert und mit Chimera 1.11.2 erstellt.

Bei Betrachtung der elektrostatischen Oberfläche von MTG ist erkennbar, dass die negativen Ladungen vornehmlich in der Spalte des aktiven Zentrums lokalisiert sind, wohingegen der überwiegende Teil der restlichen Oberfläche positive Ladungen aufweist. In der Spalte des aktiven Zentrums befinden sich viele saure Aminosäuren (Asp1, Asp2, Asp4, Glu249, Asp255 und Glu300). Betrachtet man die Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren auf der Oberfläche der MTG fällt auf, dass sich viele hydrophobe Aminosäuren um das aktive Zentrum häufen (Trp59, Tyr62, Trp69, Tyr75, Tyr278, Tyr291 und Tyr302). Diese Oberflächenstruktur ist vermutlich für die Substratspezifität der MTG verantwortlich (Abbildung 7) [50].

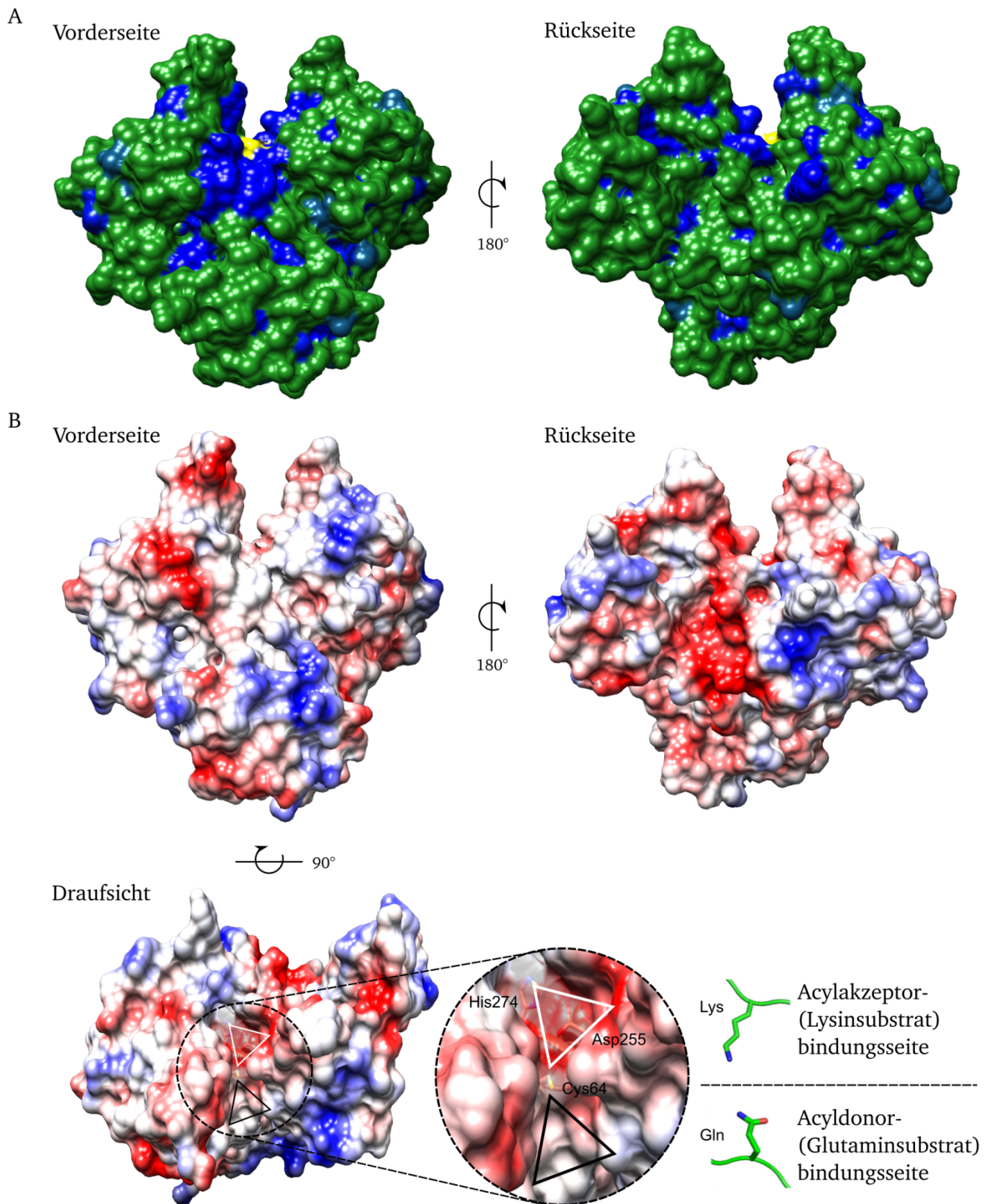


Abbildung 7: Oberflächenbeschaffenheit der mikrobiellen Transglutaminase (PDB: 1IU4).

A) hydrophobe Oberflächenbeschaffenheit: aromatische und hydrophobe Aminosäuren sind blau, Cys64 gelb und die restlichen AS grün gefärbt. B) elektrostatische Oberflächenbeschaffenheit: Die Oberfläche wurde mit Chimera berechnet und ist rot bis blau koloriert, im Bereich von -10.0 bis 10.0 K_bT (K_b , Boltzmann Konstante, T, absolute Temperatur). Diese Abbildung wurde von Fiebig *et al.* [82] übernommen, modifiziert und mit Chimera 1.11.2 erstellt.

Im aktiven Zentrum bilden die Aminosäuren Cys64, Asp255 und His274 eine Cysteinprotease-ähnliche katalytische Triade. Allerdings sind im Vergleich zu humanen TGasen die Positionen der katalytisch wichtigen Aminosäuren His274 und Asp255 relativ zum Cys64 gespiegelt angeordnet [50]. Durch die Spalt-ähnliche Form des aktiven Zentrums sind die katalytischen Aminosäuren von 2 Seiten zugänglich. Somit wird der Zugang sowohl für das Acyldonor- als auch das Acylakzeptorsubstrat ermöglicht. Auf der Vorderseite, welche in direkter Nähe zum katalytisch aktiven Cystein steht, befinden sich hauptsächlich hydrophobe und teilweise wenig geladenen AS-Reste. Im Gegensatz dazu ist die Rückseite des aktiven Zentrums stark negativ geladen. Die Position des Cysteins und die Ladungsverteilung legen nahe, dass die Annäherung des Acyldonors (Glutaminsubstrats) an der Vorderseite der Spalte erfolgt. Wohingegen die negativen Ladungen und die Anordnung des katalytischen His/Asp die Anlagerung des positiv geladenen Acyldonors (Lysinsubstrates) nahelegen. Diese Anordnung ermöglicht dann die Ausbildung eines ternären Komplexes und die Katalyse (Abbildung 7) [82].

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des aktiven Zentrums und der beteiligten Aminosäuren wurde der katalytische Mechanismus von Cysteinproteasen auch für MTG postuliert (Abbildung 8). In Schritt A greift danach das Thiolation des Cys64 die Seitenkette eines Gln-Restes nukleophil an. In den Schritten B und C gibt Asp255 ein Proton an den Amidstickstoff des resultierenden Oxyanion- oder Acyl-Enzym-Intermediates unter Freisetzung von Ammoniak ab. In Schritt D bindet ein Acylakzeptor, hier die Seitenkette eines proteingebundenen Lysins, im aktiven Zentrum und greift nukleophil den Thioester des Acyl-Enzym-Komplexes an. Das basische Asp255 unterstützt durch Übernahme des freiwerdenden Protons. In den Schritten E und F wird das Thiolat von Cys64 aus dem zweiten Oxyanion verdrängt, und somit die katalytische Reaktion abgeschlossen (Abbildung 8) [50].

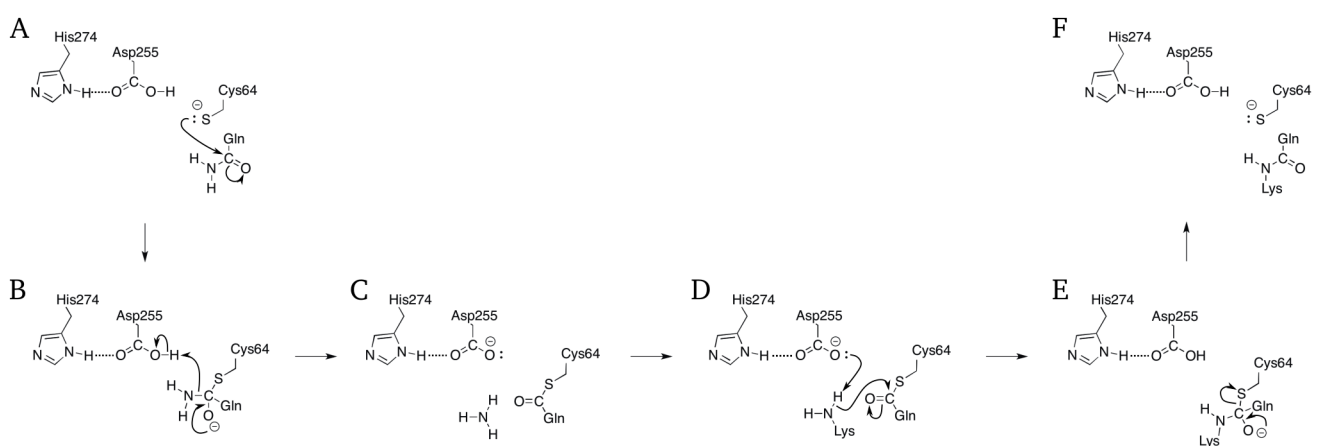


Abbildung 8: Hypothetischer Katalysemechanismus der mikrobiellen Transglutaminase.

Cys64, Asp255 und His274 repräsentieren die katalytische Triade im aktiven Zentrum der MTG. Gln und Lys sind die Reste von Substratproteinen. Diese Abbildung wurde von Kashiwagi *et al.* [50] übernommen, modifiziert und mit Chemdraw 15.0 erstellt.

Die zentrale Rolle des Asp255 in der katalytischen Triade der MTG wird durch folgende Umstände gestützt. Unter den Aminosäuren mit polaren Seitenketten hat Asp255 den geringsten räumlichen Abstand zu His274. Außerdem weist eine Proteinvariante, bei der Asp255 durch Alanin ersetzt wurde (D255A), eine bis nahe Null reduzierte Aktivität auf. Im Gegensatz dazu scheint His274 keine essentielle Rolle bei der Katalyse zu spielen. Eine Enzymvariante mit Alanin in der Histidin-Position (H274A) weist eine um nur 50% reduzierte Aktivität im Vergleich zum *wt*-Enzym auf. Aus diesem Grund ist es auch vorstellbar, dass MTG für die Katalyse nur eine katalytische Diade aus Cys64 und Asp255 nutzt, bei der His274 nur die Funktion hat, Asp255 durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu positionieren und die Konformation des aktiven Zentrums zu stabilisieren [50]. Ein weiterer Unterschied der MTG zu humanen TGasen ist eine breitere Substratspezifität für den Acyldonor und eine höhere Reaktionsrate [83]. Verantwortlich dafür könnte zum einen der hohe Flexibilitätsgrad der rechten Spaltwandung sein, welcher den sterischen Anspruch von Enzymseitenketten im aktiven Zentrum bei Annäherung eines Substratproteins senkt. Zum anderen ist das Cys64 ausreichend zum Wasser orientiert und dürfte somit ungehindert mit dem Substrat reagieren können [50].

1.2.4. Substratspezifität der mikrobiellen Transglutaminase

Erste Untersuchungen zur Substratspezifität der MTG für Acyldonatoren erfolgten mit Hilfe von Heptapeptiden (Ausgangspeptid: GGGQGGG) bei denen jedes Glycin individuell durch unterschiedliche Aminosäuren ersetzt wurde. Diese Studie zeigt, dass hydrophobe Aminosäuren *N*-seitig von Gln, im Vergleich zum Ausgangspeptid die Reaktion beschleunigen (in (-3)-, (-2)- und (-1)-Position). Alle getesteten Peptide wiesen jedoch eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich mit dem Modells substrat Z-Gln-Gly auf [84]. In weiterführenden Studien wurde mit Hilfe von Phagen- und mRNA-Display-Peptid-Bibliotheken (Selektion aus bis zu 10¹¹ Varianten) die Substrataffinität untersucht [85, 86]. Die am häufigsten isolierten Klone trugen Peptide mit aromatischen Aminosäuren (W, F und Y) in der (-5)- bis (-3)-Position, einem Arginin oder einer hydrophoben Aminosäure in der (+1)- bzw. (+2)-Position und hydrophobe Aminosäuren in der (-2)- und (-1)-Position [85].

Zusätzlich zur Primärsequenzspezifität um das reaktive Glutamin wiesen Experimente darauf hin, dass die lokale Sekundärstruktur ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Bindung von MTG an Substratproteine spielt. So konnte anhand einer Peptidsequenz, die im Dispase-Autolyse-induzierenden Protein (DAIP, P84908), einem intrinsischen MTG-Substrat, einen β -Turn ausbildet, die Bedeutung der Sekundärstruktur nachgewiesen werden. Diese Schleife bei Gln298 wurde durch Einführung einer Cysteinbrücke in einem synthetischen Peptid und C-terminalen Verlängerung eines Immunglobulins nachgebildet. Dabei zeigte sich, dass diese strukturelle Modifikation auf Sekundärstrukturebene die

Markierbarkeit des Peptides durch MTG im Vergleich zum offenen Ausgangspeptid erheblich erhöht [87].

Offensichtlich besteht auch ein Zusammenhang zwischen Teilen einer Substratpolypeptidkette mit relativ hohen B-Faktoren (erhöhte Flexibilität), die durch Kristallographie ermittelt wurden, und dem Zugang von Proteasen oder Transglutaminase für limitierte Proteolyse oder spezifische Quervernetzung. Dies hebt die Rolle der Kettenflexibilität und lokalen Entfaltung im Bereich der MTG-Bindestelle hervor. Es wird angenommen, dass eine erhöhte Flexibilität eines Proteinsegments eine darauf beschränkte, enzymatische Reaktionen durch MTG und Proteasen begünstigt. Das gilt auch für andere posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung [88]. Diese Annahme konnte durch die Kristallisation und Charakterisierung des DAIP betätigt werden. Die Kristallisation und Produktion von Glutamin-Deletionsvarianten des DAIP's führte zu einer genaueren Charakterisierung der Substraterkennung intrinsischer Substrate durch MTG [82]. Im Vergleich mit Glutaminen von β -Faltblattstrukturen können Glutamine in zugänglichen und flexiblen Loopregionen effizienter modifiziert werden. Der Grund liegt wahrscheinlich in der besseren Ausrichtung der zu markierenden AS-Reste hin zum katalytischen Cystein, die die höhere Flexibilität der betreffenden Proteinregion zulässt [82].

1.3. Intrinsische Transglutaminase-Substrate von *S. mobaraensis*

Für die Identifizierung von Glutamindonor-Proteinen werden markierte primäre Amine genutzt. Als Reportergruppe dienen radioaktive Substanzen, Fluorophore und Biotin. Um reaktive Lysine von Proteinen zu detektieren, benötigt man markierte Glutaminpeptide, die aus wenigstens zwei Aminosäuren bestehen und vom TGase-Typ abhängen. Das Dipeptid Cbz-Glutaminylglycin (ZQG) ist beispielsweise ein gut charakterisiertes Glutamindonorsubstrat der MTG (Abbildung 9) [89].

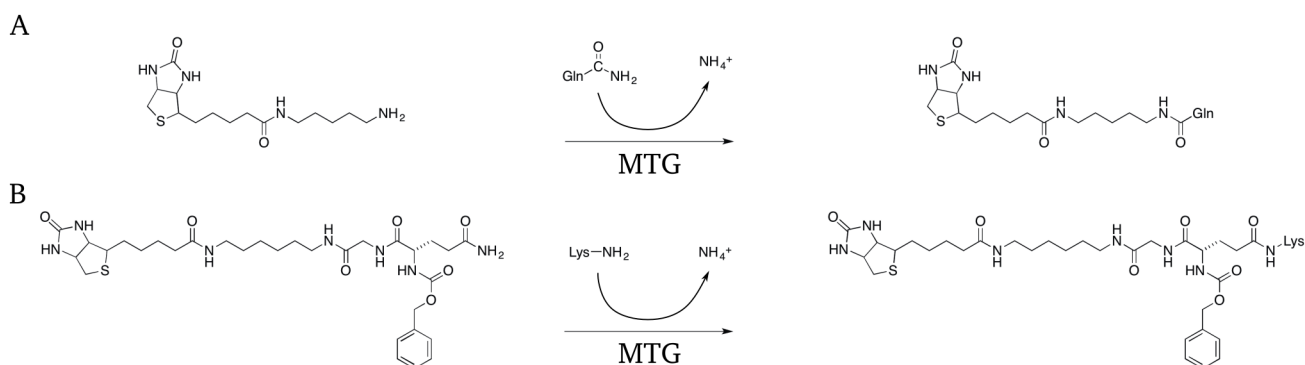


Abbildung 9: Biotinylierte TGase-Substrate für die Identifizierung von MTG-Bindestellen.

Gln und Lys stehen für protein- oder peptidgebundene Glutamine und Lysine. A) Kopplung von Mono-Biotinylcadaverin mit einem Glutamindonor-Protein. B) Kopplung des biotinylierten Glutaminpeptides ZQGB mit einem Lysindonor-Protein. Diese Abbildung wurde von Schmidt *et al.* [89] übernommen, abgewandelt und mit Chemdraw 15.0 erstellt.

Mit Hilfe dieser Methodik wurden durch die Arbeitsgruppe Fuchsbauer drei wesentliche intrinsische MTG-Substrate identifiziert und charakterisiert, nämlich die bereits erwähnten SSTI, DAIP und SPI [55, 89, 90]. Ihr Einbau in die äußere Proteinhülle durch MTG führt möglicherweise bei *S. mobaraensis* zum Aufbau einer antibakteriellen Schutzschicht [55]. Darüber hinaus spielt eine Kaskade extrazellulärer Proteasen und Proteaseinhibitoren bei der Apoptose-ähnlichen Differenzierung von Streptomyceten eine wichtige Rolle [4].

1.3.1. *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMP-Inhibitor

Viele Actinomyceten produzieren kleine inhibitorische Proteine gegen Subtilisin (P00782), Trypsin (P00760) und Chymotrypsin (P00766). Aufgrund ihrer hohen Spezifität gegenüber Subtilisin werden sie als *Streptomyces*-Subtilisin-Inhibitoren (SSI) bzw. SSI-ähnliche Protease-Inhibitoren (SIL) bezeichnet. Die erste Charakterisierung erfolgte 1974 mit einer Variante des SSI (P01006) aus *S. albogriseolus* S-3253 [91, 92]. Mitglieder der SSI-Familie (I16) weisen thermoresistente Proteinstrukturen auf und bilden ein Dimer aus identischen Untereinheiten. Bei der Bindung/Inhibierung der Serinprotease kommt es im SSI-Homodimer zu konformationellen Umlagerungen von flexiblen zu rigiden Strukturen [93]. Beim SSI von *S. albogriseolus* ist maßgeblich das Met104 an der Bindung von Subtilisin involviert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Austausch in dieser Position durch Lys (Arg) und Tyr (Trp) die Inhibierung von Trypsin-ähnlichen bzw. Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen ermöglicht [92]. Bei weiterführenden Charakterisierungen von SSI-Varianten wurde festgestellt, dass diese neben Subtilisin-ähnlichen Proteasen eine durch *S. griseus* produzierte Metalloprotease, die *S. griseus* Metallo-Endopeptidase II, (SGMPPII; Griselysin, SgmA, B1W035/Q83WH1) inhibieren [94]. Mutationsexperimente gaben Anlass zu der Vermutung, dass Subtilisin und SGMPPII um dieselbe Bindestelle am SSI konkurrieren [94]. Die Substitution/Deletion des an der Subtilisin-Inhibierung involvierten Met und dessen umliegenden AS konnte die Bindung an die SGMPPII jedoch nicht entscheidend schwächen. Ein anderes Beispiel für diese Art von Bifunktionalität stellt der SSI-ähnliche Inhibitor ScNPI (Q9FDS0) aus *S. caespitosus* dar. ScNPI wurde ursprünglich aus dem undefinierten *Streptomyces*-Isolat I-355 isoliert und inhibiert Subtilisin sowie die neutrale Metalloprotease ScNP (P56406) aus *S. caespitosus* [95]. Als Bindestelle für den ScNPI konnte ein Tyr identifiziert werden, welches 2 AS vom N-terminalen Cys und gegenüber des Subtilisin-affinen Met lokalisiert ist. Ein Austausch dieser AS führte zur Inaktivierung des ScNPI [95]. Bemerkenswert ist, dass dieses Tyr in SSI- und SIL-Varianten von anderen Streptomyceten nicht auftritt, auch nicht in dem SGMPPII-inhibierenden SSI.

Auch *S. mobaraensis* produziert ein 12 kDa großes Subtilisin-Inhibitorprotein, das neben Subtilisin die Aktivität von TAMP reduziert [72]. Dies führte zu seiner Benennung als *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMP-Inhibitor (SSTI, P83544). Anhand der hohen Sequenzhomologie und der postulierten

Sekundärstruktur wurden die AS Lys108 und Glu109 als reaktive AS für die Inhibierung von Subtilisin identifiziert. Neben den benannten Proteasen inhibiert SSTI Trypsin [72], was durch das Auftreten des Lys108 an Stelle des Methionins anderer SSI-Varianten erklärt werden kann. Für die Inhibierung der TAMP wurde bis dato noch keine Bindestelle bestimmt. Gegen die identifizierte ScNPI-Bindestelle spricht, dass SSTI an Stelle des reaktiven Tyrosins ein hoch konserviertes Prolin besitzt.

Wie alle Mitglieder dieser SSI-Familie nimmt SSTI eine temperaturstabile Proteinstruktur ein und liegt als Homodimer mit einer Molmasse von 24 kDa vor. Aufgrund seiner Häufigkeit in der Submerskultur und der spezifischen Inhibierung der TAMP ist er maßgeblich an der Regulation der MTG beteiligt [72]. In jungen Submerskulturen von *S. mobaraensis* kann SSTI durch MTG markiert werden [89]. Bei der weiteren Kultivierung verliert SSTI jedoch die Fähigkeit vernetzt zu werden. Dies erfolgt vermutlich durch Abnahme der Anzahl an reaktiven Glutaminen. Die lysinseitige Markierbarkeit bleibt über die gesamte Kultivierungszeit unverändert erhalten. Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass SSTI irreversible Modifikationen nach seiner Sekretion erfährt. Der Verlust an reaktiven Endo-Glutaminen wurde dabei mit intramolekularen Quervernetzungen sowie Deamidierungsreaktionen erklärt [89]. Interessanterweise zeigte sich, dass Lipoaminosäuren wie *N*-Lauroylsarcosin als Modulatoren fungieren. Diese legen vermutlich Carboxamidgruppen proteingebundener Glutamine aus dipolaren und hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Proteinrückrad frei und vermitteln so die Interaktion mit der MTG [89].

1.3.2. Dispase Autolyse-induzierendes Protein von *S. mobaraensis*

Das Dispase Autolyse-induzierende Protein von *S. mobaraensis* (DAIP, P84908) hat eine Molekülmasse von 37 kDa und besitzt in seiner Struktur 5 Glutamine und 10 Lysine. Substrate des DAIP stellen Metalloproteasen der Thermolysin-Familie M4 dar, welche in Gegenwart von DAIP Autolyse vollziehen. Der zu Grunde liegende Mechanismus, der hinter dem Selbstabbau spezifischer Metalloproteasen steht, wurde bis dato nicht publiziert, ist aber Gegenstand der Forschung in der Arbeitsgruppe Fuchsbauer. Eine proteolytische Aktivität des DAIP kann nach bisherigen Kenntnisstand ausgeschlossen werden und der Einfluss von Calcium- und Zink-Ionen ist vernachlässigbar gering [90]. Durch exponierte Glutamin- und Lysinreste fungiert DAIP als intrinsisches Substrat der MTG. Die Markierbarkeit geht, ähnlich wie bei SSTI, im Laufe der Submerskultivierung von *S. mobaraensis* verloren. Durch Zugabe des Lipopolyamins *N*-Lauroylamido-3-*N'*,*N'*-dimethylpropylamin als Substratmodulator können Glutamin- und Lysinreste für die Markierbarkeit durch MTG zugänglich gemacht werden [90].

Kristallographische Untersuchungen und die rekombinante Produktion von Glutamin-Deletionsvarianten ermöglichten eine eingehendere Untersuchung der Substrateigenschaften des DAIP und lieferten so nähere Einblicke in die Substratbindung der MTG. Die Struktur des DAIP zeigt einen

klassischen 7-blättrigen β -Faltblatt-Propeller. Kinetische Untersuchungen der Glutamin-Deletionsvarianten zeigten, dass von den 5 Glutaminen des DAIP die Glutamine Gln39, Gln298 und Gln345 die bevorzugten Markierungsstellen von MTG sind. Gln65 und Gln144 sind ebenfalls für die MTG zugänglich, jedoch erfolgt nur eine geringe Markierung dieser Glutamine, wenn die anderen Glutamine ausgeschaltet sind. Eine DAIP-Variante, welche nur noch das Gln39 enthält, wird im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein aus *S. mobaraensis* ähnlich schnell glutaminseitig markiert. Nach 30 Minuten erreicht diese Variante 57% der Markierung des Wildtyp-Proteins und weist damit die höchste Markierungseffizienz der untersuchten DAIP-Varianten auf [82].

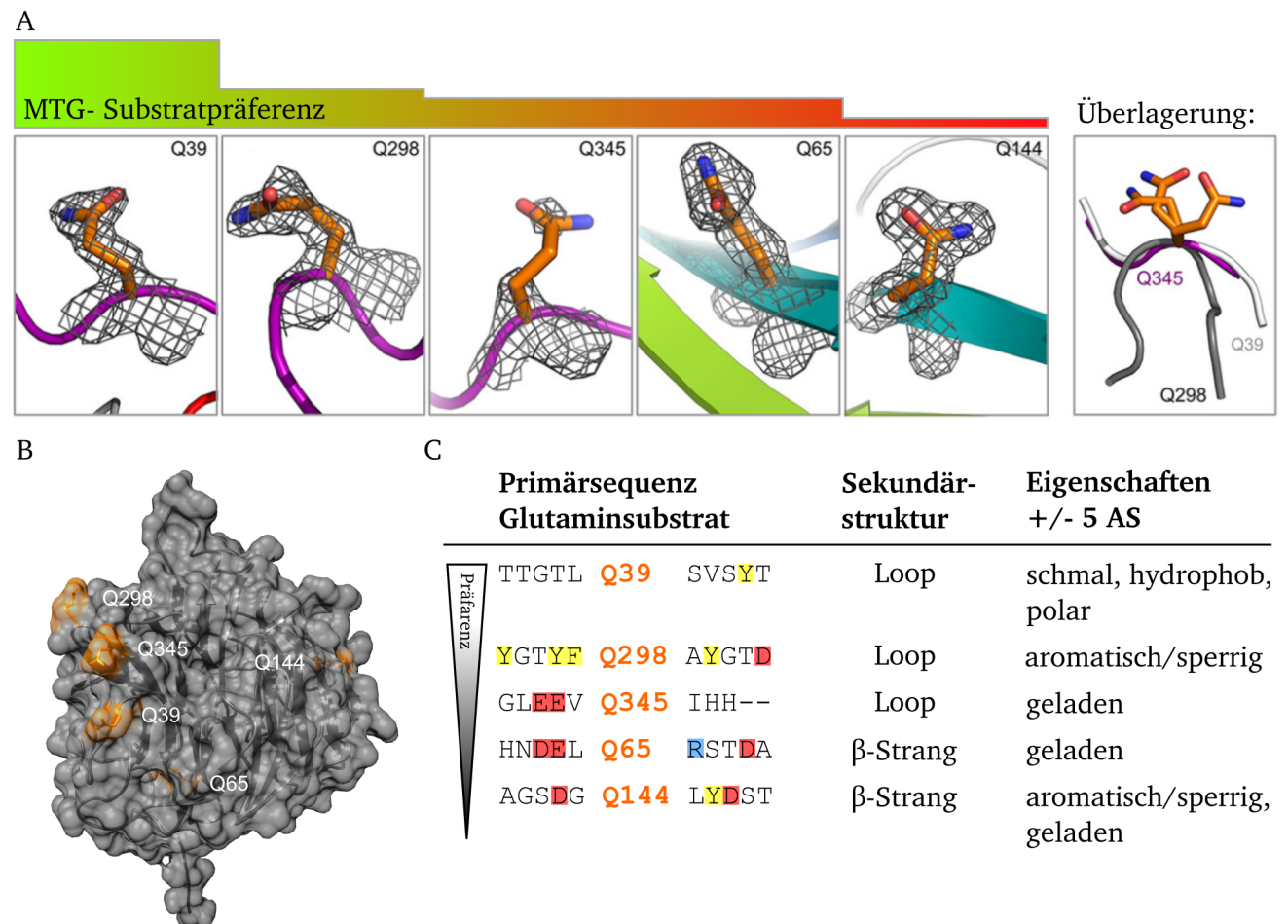


Abbildung 10: Kristallstruktur des DAIP (PDB: 5FZP).

Diese Struktur ermöglicht Einblicke in die Beschaffenheit der MTG-Markierungsstellen. A) Großaufnahme der 5 Glutamine des DAIP sortiert nach Markierungspräferenz der MTG. Eine verfeinerte $2F_o - F_c$ Karte mit einem *Counter Level* von 1.0 σ ist für jedes Glutamin in grau dargestellt. Die MTG-Markierungspräferenz ist mit einem Farbgradienten von grün nach rot über den Abbildungen gezeigt. Die linke Abbildung zeigt eine Überlagerung der Gln39-, Gln298- und Gln345-Loop-Region relativ zum Glutamin Rückgrat. B) Oberflächendarstellung des DAIP (grau): Dargestellt ist die Lage und die Lösungsmittel-Zugänglichkeit der Glutamine (orange). Die Glutamine Gln39, Gln298 und Gln345 sind Lösungsmittel exponiert, Gln65 und Gln144 sind verdeckt und weniger zugänglich. C, Darstellung der flankierenden +/- 5 AS der betreffenden Glutamine und deren Eigenschaften sowie die Sekundärstruktur. Diese Abbildung wurde von Fiebig *et al* [82] übernommen, modifiziert und mit Chimera 1.11.2 erstellt.

Die strukturelle Überlagerung der Glutamine Gln39, Gln298 und Gln345 zeigt Ähnlichkeit in der Proteinkonformation bei Gln39 und Gln345, die jedoch bei Gln298 signifikant anders erscheint. Das bedeutet, dass Flexibilität und Zugänglichkeit eine Voraussetzung für die Modifikation durch MTG sind, jedoch durch weitere Eigenschaften der Substratstruktur beeinflusst werden (Abbildung 10). Die Glutamin-flankierenden Aminosäuren führen zu dem Schluss, dass die physikalischen Eigenschaften in der Reihenfolge klein/polar/hydrophob/ungeladen >> sperrig/aromatisch > geladen die Markierbarkeit des betreffenden Glutamins fördern. Jedoch sind weitere strukturelle Experimente mit anderen MTG-Substraten notwendig, um die Substratpräferenz der MTG näher zu beschreiben.

1.3.3. *Streptomyces*-Papain-Inhibitor

Neben den schon genannten proteinösen Proteaseinhibitoren produziert *S. mobaraensis* einen weiteren Inhibitor der als MTG-Substrat identifiziert werden konnte. Dieser Inhibitor richtet sich vornehmlich gegen Papain, Bromelain und Trypsin. Papain stellt die sensitivste Protease für diesen Inhibitor dar, daher erfolgte seine Benennung als *Streptomyces*-Papain-Inhibitor (SPI, P8624) [55]. Neben seiner Ähnlichkeit in Bezug auf seine molekulare Masse von 12 kDa und der hohen Thermostabilität weist SPI klare strukturelle Unterschiede im Vergleich zu der Familie der SSI's auf. Beispielsweise sind die Cysteine der beiden putativen Cysteinbrücken des SPI in anderen Regionen der Primärsequenz lokalisiert als bei Proteinen der SSI-Familie. Desweiteren bildet SPI im Gegensatz zum SSTI keine Dimere aus. Reifer SPI (110 AS) besitzt nach der proteolytischen Abspaltung des 33 AS großen Signalpeptids drei Glutamin- und sechs Lysinreste, die als potentielle Vernetzungsstellen für die MTG zur Verfügung stehen [30]. Es konnte nachgewiesen werden, dass SPI als Lysin- und Glutamindonorsubstrat agiert. Es kommt jedoch bei der Submerskultivierung von *S. mobaraensis* zu einer verhältnismäßig schnellen Hydrolyse der γ -Carboxamid Seitenketten exponierter Glutamine durch MTG, weshalb die glutaminseitige Markierbarkeit verloren geht [55]. Eine genaue Bestimmung der Glutaminbindestelle von MTG war bis zum Beginn dieser Arbeit nicht erfolgt.

Durch rekombinante Produktion des SPI in *E. coli* konnte Zindel zeigen, dass die inhibitorische Wirkung des SPI nicht durch das Protein selbst erzeugt wird [30]. Diese Feststellung führte zu der Annahme, dass das SPI-Protein (SPI_p) ein kofaktorbindendes Protein ist. Erste Untersuchungen wiesen auf einen ca. 600 – 700 Dalton großen Kofaktor (SPI_{ac}) hin, welcher vermutlich die inhibitorische Aktivität gegenüber den genannten Proteasen vermittelt. Bis dato ist jedoch unklar, ob eine Interaktion des Proteins mit dem niedermolekularen Inhibitor besteht und welche biologische Funktion damit verbunden ist. Ein Vergleich der SPI Primärsequenz mit anderen Proteinen zeigte strukturelle Verwandtschaft zu folgenden Proteinen: Expansine (F1DTC5, *Meloidogyne javanica*), Lipoproteine (A0A0M8QYC6, *S. rimosus*), Pherophorin-dz1 Proteine (C5p8S7, *Coccidioides posadasii*), Prolin- und Threonin-reiche Proteine (Q3HYB8, *Coccidioides posadasii*), Barwin-ähnliche Endoglukonasen

(S3E833, *Glarea lozoyensi*) und Allergene wie ASP f 7 (H0ENE8, *Glarea lozoyensis*). Alle aufgeführten Proteine haben 4 hoch konservierte Cysteine als gemeinsames Merkmal. Ein Nachweis für die funktionale Verwandtschaft zu einem dieser Proteine konnte jedoch nicht erbracht werden. Berechnungen der Sekundärstruktur und die daraus abgeleitete Tertiärstruktur ließen auf eine funktionelle Homologie zu Glykosylhydrolasen der Familie GH45 schließen, die polymere Zucker hydrolysieren. Erste Untersuchungen mit Dextran, Saccharose, Agarose, Stärke, Cellulose, Carboxymethylcellulose und Chitin zeigten keine hydrolytische Aktivität des SPI_p [30].

Die weitere Untersuchung des SPI beschränkte sich auf die Charakterisierung der inhibitorischen/antibakteriellen Aktivität des Holo-Proteins (SPI_p + SPI_{ac}). Holo-SPI zeigt inhibitorische Eigenschaften gegen die Cysteinproteasen Gingipain K und R1 (KGP und RPG) von *Porphyromonas gingivalis*, einem pathogenen Mundbakterium, welches für die Ausbildung von Zahnfleischentzündungen verantwortlich ist. Die inhibitorische Aktivität des Holo-SPI gegenüber KGP und RPG im Kulturüberstand von *P. gingivalis* liegt im nanomolaren Bereich, wobei die Aktivität gegenüber KGP um eine Größenordnung höher ist als bei RPG. Untersuchungen mit weiteren Mikroorganismen zeigten, dass eine unbekannte Protease in der Kulturbrühe von *B. anthracis* inhibiert werden kann. Da dieser Organismus keine bekannten Cysteinproteasen sekretiert, wurde aufgrund der inhibierenden Eigenschaften des Holo-SPI die Beeinträchtigung einer essentiellen Serinprotease vermutet [30, 55]. SPI stellt daher ein interessantes Forschungsfeld für die Entwicklung neuer antibiotischer Substanzen dar.

1.4. Fragestellung und Zielsetzung

Die Motivation für diese Arbeit lieferten vorangegangene Studien, die Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von MTG und proteinöser Proteaseinhibitoren im Lebenszyklus von *S. mobaraensis* beschreiben [55, 89, 90]. Beispielsweise wurden Regulationsmechanismen wie die Inhibierung der TAMP-Aktivität während der proMTG-Aktivierung zum reifen Enzym durch SSTI untersucht, die zur Steuerung der MTG-Aktivität maßgeblich beitragen [72]. Trotz der Strukturaufklärung der proMTG sowie der MTG durch Kristallographie und struktureller/kinetischer Untersuchungen an einem intrinsischen Substrat (DAIP) der MTG ist der genaue Substraterkennungs- und Bindemechanismus nicht verstanden [50, 80, 82]. Über das Interesse an der Funktion von MTG im Lebenszyklus von *S. mobaraensis* hinaus wächst in der Pharmaindustrie der Stellenwert des Enzyms wegen seiner spezifischen Kopplung von Biomolekülen [33, 81]. Ein besseres Verständnis für die Substraterkennung und die Kopplungsreaktion der MTG könnte zur Entwicklung maßgeschneiderter zielgerichtet vernetzbarer Biomoleküle beitragen.

Neben der Rolle als intrinsisches MTG-Substrat weisen Studien darauf hin, dass Holo-SPI bzw. SPI_{ac} durch die spezifische Inhibierung von Cystein- und Serinproteasen eine wirkungsvolle antibakterielle

Substanz gegen bestimmte Krankheitserreger ist [30, 55, 96]. Sollte diese Substanz neuartig sein, könnte sie eine Leitstruktur für neue antibakterielle Wirkstoffe darstellen.

Vor diesem Hintergrund ergaben sich folgende der Priorität nach geordnete Ziele:

1. Aufklärung der Struktur und Funktion des SPI_p und SPI_{ac} mit
 - a. Strukturaufklärung des SPI_p durch Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse,
 - b. Identifikation der glutaminseitigen Bindestellen für MTG anhand der Struktur des SPI_p und Glutamindeletionsvarianten,
 - c. Charakterisierung der MTG-Substrat-Interaktion anhand von Substitutionsvarianten des SPI_p,
 - d. Reinigung und Strukturaufklärung des SPI_{ac} sowie
 - e. Charakterisierung des SPI_{ac} als Proteaseinhibitor und möglicher Kofaktor für SPI_p.
2. Aufklärung der Struktur des SSTI sowie dessen Interaktion mit MTG und TAMP mit
 - a. Strukturaufklärung des SSTI mit Hilfe von Proteinkristallisation,
 - b. Identifikation der glutaminseitigen Bindestellen für MTG sowie
 - c. Rekombinante Produktion von TAMP und Identifikation der Interaktionsstellen von rTAMP mit Varianten des SSTI.
3. Weiterführende Charakterisierung der MTG-Substrat-Interaktion aufbauend auf den Erkenntnissen der strukturellen Charakterisierung von SPI und SSTI.

Die strukturelle Untersuchung des SPI und SSTI sowie die Charakterisierung dieser Proteine als Substrate der MTG dienen dem besseren Verständnis der Enzym-Substrat-Interaktion von MTG und ihren Substraten sowie der Klärung der Rolle von SPI und SSTI im Lebenszyklus von *S. mobaraensis*.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mikroorganismen

Streptomyces mobaraensis (DSM Nr. 40847):

Witt und Stackebrandt 1991 (Nagatsu und Suzuki 1963)

Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

Escherichia coli:

XL1-Blue:

[recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F'[proAB lacI^qΔM15 Tn10 Tet^R]]

Agilent Technologies, #200249

BL21 (DE3):

[F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ(DE3)]

Merck, Novagen, #69450

BL21 (DE3) pLysS:

[F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ(DE3)[pLysS Cam^R]]

Merck, Novagen, #69451

2.1.2. Plasmide

Name	Eigenschaften	Herkunft
pET22b(+)	[Amp ^R , lacI], <i>pelB</i> -Sequenz N-terminal, Basen für His ₆ -Tag C-terminal im Leseraster, 5493 bp	Merck, Novagen, #69744
pET22b(+)-SSTI _{opt}	Integration von wtSSTI(36-148) (P83544) durch NdeI und XhoI in pET22b(+), inkl. <i>pelB</i> -Sequenz, 5775 bp N-terminal codierende Basen für Methionin und C- terminal für LE-His ₆ eingefügt.	erzeugt von Fiebig (2015, AG Fuchsbauer)
pUC57-SPI _{opt}	wtSPI(34-143) (P86242) in pUC57, 3094 bp	GenScript
pUC57-proTAMP _{opt}	wtTAMP(34-760) (P83543) in pUC57	GenScript
pET22b(+)-proMTG	Integration von proMTG(32-407) (P81453) durch NcoI und EcoRI in pET22b(+), ohne <i>pelB</i> -Sequenz, 6552 bp, N-terminal codierende Basen für Methionin und C-terminal für His ₆ eingefügt.	AG Kolmar, Biochemie TU Darmstadt

2.1.3. Oligonukleotide (*Primer*)

Die verwendeten Oligonukleotide für PCR-Ansätze wurden von der biomers.net GmbH im Format *Synthese-Scale XS* hergestellt und nach Kartuschen-Reinigung lyophilisiert.

Primer-Name	Oligonukleotidsequenz (5'-3')
SPlopt-for	AAAAGCCATGGACATCCCGATTGGTCAG
SPlopt-rev	TTTTCTCGAGTTAGCGCACGAATTTCCAGGTAATGCC
SSTlopt-for	AAAAAATGGCCAGCCTGTATGCCCCGTCTG
SSTlopt-rev	AAAAAACTCGAGTTAGAATTCAAAAACGGTGCCTTTACCAG
TAMPopt-SP1-for	TGCTGGCGGTGGGCGTGCAGACCACCAGCGCGAACGCGGGCCAGGACAAAGCGGC
TAMPopt-SP2-for	CCGCGCGGTGGCGACCGGCGCGCTGGTGGCGGTGACCGCGATGCTGGCGGTGGGC
TAMPopt-SP3-for	AAAACATATGCGCCCGACCCCGCAGCGCCGCGCGGTGGCG
TAMPopt-rev	AAAACCTCGAGGAAGGTCAGACGC
6AS-SSTI-for	AGCCGGCGATGGCCGCGCCGGCGGCTCAGCAAAGC
6AS-SSTI-rev	GCTTTGCTGAGCCGCGCGCGGCCATCGCCGGC
3AS-SSTI-for	CCGGCGATGGCCGCTCAGCAAAGC
3AS-SSTI-rev	GCTTTGCTGAGCGGCCATCGCCGG
Y41A-SSTI-for	ATGGCCAGCCTGGCTGCCCCGTCTGCA
Y41A-SSTI-rev	TGCAGACGGGGCAGCCAGGCTGGCCAT
Y41R-SSTI-for	ATGGCCAGCCTGCGTGCCCCGTCTGCA
Y41R-SSTI-rev	TGCAGACGGGGCAGCGAGGCTGGCCAT
M70S-SSTI-for	CCCTGAACTGCAGCCCGAAACCGAGCG
M70S-SSTI-rev	CGCTCGGTTTCGGGCTGCAGTTCAGGG
K72E-SSTI-for	TGCATGCCGGAACCGAGCGGC
K72E-SSTI-rev	GCCGCTCGGTTCCGGCATGCA
K72R-SSTI-for	ATGGCCAGCCTGCGTGCCCCGTCTGCA
K72R-SSTI-rev	TGCAGACGGGGCAGCGAGGCTGGCCAT
K72S-SSTI-for	TGCATGCCGAGCCCGAGCGGCACG
K72S-SSTI-rev	CGTGCCGCTCGGGCTCGGCATGCA
K108A-SSTI-for	GGTACCGCGTGCACGGCGGAATGGAATCCGTTC
K108A-SSTI-rev	GAACGGATTCCATTCCGCCGTGCACGCGGTACC
E109A-SSTI-for	CCGCGTGCACGAAAGCGTGGAATCCGTTC
E109A-SSTI-rev	GAACGGATTCCACGCTTTCGTGCACGCGG

K108A-E109A-SSTI-for	GGTACCGCGTGCACGGCGGCCTGGAATCCGTTCTGTG
K108A-E109A-SSTI-rev	CACGAACGGATTCCAGGCCGCCGTGCACGCGGTACC
Δ S-SSTI-for	CCGGCGATGGCCCTGTATGCCCCG
Δ S-SSTI-rev	CGGGGCATACAGGGCCATCGCCGG
Δ SL-SSTI-for	CCGGCGATGGCCTATGCCCCGTCT
Δ SL-SSTI-rev	AGACGGGGCATAGGCCATCGCCGG
Δ SLY-SSTI-for	CGGCGATGGCCGCCCGTCTGC
Δ SLY-SSTI-rev	GCAGACGGGGCGGCCATCGCCGG
Δ SLYAP-SSTI-for	AAAAAATGGCCAGCGCACTGGTCCTGACCGTTG
Δ SLYAP-SSTI-rev	AAAAAACTCGAGTTAGAATTCAAAAACGGTGCCTTTACCAG
Q6N-SPI-for	GGACATCCCGATTGGTAACAAAATGACCGG
Q6N-SPI-rev	CCGGTCATTTTGTACCAATCGGGATGTCC
Q32N-SPI-for	ATTGATGCGAGCTCTAACGATCTGGTCGCC
Q32N-SPI-rev	GGCGACCAGATCGTTAGAGCTCGCATCAAT
Q87N-SPI-for	TCGACCTGAGCAACGCAGCTTTTGCG
Q87N-SPI-rev	CGCAAAAGCTGCGTTGCTCAGGTCGA
K7A-SPI-for	CATCCCGATTGGTCAGGCGATGACCGGTAAAATG
K7A-SPI-rev	CATTTTACCGGTCATCGCCTGACCAATCGGGATG
K7D-SPI-for	CATCCCGATTGGTCAGGGCATGACCGGTAAAATG
K7D-SPI-rev	CATTTTACCGGTCATGCCCTGACCAATCGGGATG
A40R-SPI-for	GCCATTCCGGCGCGTTGGTGGACCACG
A40R-SPI-rev	CGTGGTCCACCAACGCGCCGGAATGGC
N49R-SPI-for	CGAACCCGAACCGCGACCCGCTGTGCCG
N49R-SPI-rev	CGGCACAGCGGGTCGCGGTTCCGGGTTTCG
G55R-SPI-for	CGCTGTGCCGTGCGGTGAGTGTTG
G55R-SPI-rev	CAACACTCACGCGACGGCACAGCG
V109R-SPI-for	CATTACCTGGAAATTCCGCCGCTAACTCGAGC
V109R-SPI-rev	GCTCGAGTTAGCGGCGGAATTTCCAGGTAATG
S61R-SPI-for	GTGAGTGTTGAAGTCCGCTATAATGGTCGTACC
S61R-SPI-rev	GGTACGACCATTATAGCGGACTTCAACACTCAC
T9R-SPI-for	GATTGGTCAGAAAAATGCGCGGTAAAATGACCTAC
T9R-SPI-rev	GTAGGTCATTTTACCGCGCATTTTCTGACCAATC
T105R-SPI-for	CGTGAACGGCATTTCGCTGGAAATTCGTGCG

T105R-SPI-rev	CGCACGAATTTCCAGCGAATGCCGTTACAG
T9D-SPI-for	CCGATTGGTCAGAAAATGGATGGTAAAATGACCTACTACAC
T9D-SPI-rev	GTGTAGTAGGTCATTTTACCATCCATTTTCTGACCAATCGG
R65E-SPI-for	GAAGTCTCCTATAATGGTGAAACCATTGCGGTGCC
R65E-SPI-rev	GGCACGCGAATGGTTTCACCATTATAGGAGACTTC
R68E-SPI-for	GGTCGTACCATTGAAGTGCCGGTTCGTG
R68E-SPI-rev	CACGAACCGGCACTTCAATGGTACGACC
K92E-SPI-for	CAGCTTTTGCGGAACTGGCTCCG
K92E-SPI-rev	CGGAGCCAGTTCCGCAAAAGCTG
D97R-SPI-for	GGCTCCGCTGCGCCGCGGCGTCTGTG
D97R-SPI-rev	CACGACGCCGCGGCGCAGCGGAGCC
K107E-SPI-for	GGCATTACCTGGGAATTCGTGCGC
K107E-SPI-rev	GCGCACGAATTCCCAGGTAATGCC
R110E-SPI-for	CATTACCTGGAAATTCGTGGAATAACTCGAGCACCACC
R110E-SPI-rev	GGTGGTGCTCGAGTTATTCCACGAATTTCCAGGTAATG
T9E-SPI-for	CCGATTGGTCAGAAAATGGAAGGTAAAATGACCTACTACAC
T9E-SPI-rev	GTGTAGTAGGTCATTTTACCTTCCATTTTCTGACCAATCGG
A40E-SPI-for	CATTCCGGCGGAATGGTGGAC
A40E-SPI-rev	GTCCACCATTCCGCCGGAATG
G55E-SPI-for	CGCTGTGCCGTGAAGTGAGTGTTGAAG
G55E-SPI-rev	CTTCAACACTCACTTCACGGCACAGCG
S61E-SPI-for	GGCGTGAGTGTTGAAGTCGAATATAATGGTCGTACC
S61E-SPI-rev	GGTACGACCATTATATTCGACTTCAACACTCACGCC
V109E-SPI-for	CCTGGAAATTCGAACGCTAACTCGAGCAC
V109E-SPI-rev	GTGCTCGAGTTAGCGTTCGAATTTCCAGG

2.1.4. DNA und Protein Molekulargewichtsstandards

Marker	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, #SM0311
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, #26614
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, #26616
Chameleon Duo, prestained	LI-COR Biosciences, #928-60000

2.1.5. Enzyme und Proteine

Enzym/Protein	Aktivität	Ursprung	Hersteller
Papain (<i>crude powder</i>)	1.5 – 10 Units/mg	Papaya <i>latex</i>	Sigma-Aldrich, #P3375
Papain	≥ 10 Units/mg	Papaya <i>latex</i>	Sigma-Aldrich, #P4762
α -Chymotrypsin	≥ 40 Units/mg	<i>Bovine pancreas</i>	Sigma-Aldrich, #C4129
Trypsin	Mind. 2500 Units/mg	<i>Bovine pancreas</i>	AppliChem, #A3964
Thermolysin	30 – 175 Units/mg	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Sigma-Aldrich, #P1512
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	2 Units/ μ l	-	New England BioLabs, #M0530S
Tag Polymerase	-	-	Fiebig 2015 (AG Fuchsbauer)
T4-DNA Ligase	1 Weiss Unit/ μ l	-	Thermo Scientific, #EL0016
<i>rDAIP-wt</i>	-	-	Fiebig 2015 (AG Fuchsbauer)
<i>rDAIP-Q39</i>	-	-	Fiebig 2015 (AG Fuchsbauer)

2.1.6. Antikörper/Farbstoffkonjugate

Antikörper	Hersteller
Anti-His pAB produziert in Kaninchen	Carl Roth, #3742.1
Anti-rSPI pAB produziert in Kaninchen	Biogenesis, Happel 2015 (AG Fuchsbauer)
Ziege Anti-Kaninchen IRDye 800CW	LI-COR Biosciences, #926-32211
Streptavidin IRDye 800CW	LI-COR Biosciences, #926-32230

2.1.7. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben entspricht die Qualität der verwendeten Chemikalien, Feinchemikalien und Lösungsmittel pro analysis. Alle Standardchemikalien wurden über AppliChem, Merck, Carl Roth, Thermo Fisher Scientific, Sigma-Aldrich und VWR bezogen und sind hier nicht aufgeführt.

Chemikalien/Proteine/Peptide

α -Casein

Chymostatin

Dabcyl-Ser-Phe-EDANS

Leupeptin

Midori Green

N-(Dansyl)cadaverin

N-(Biotinyl)cadaverin

N,N-Dimethylcasein

Odyssey Blocking Puffer PBS

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC

Z-Gln-Gly-OH

Z-Phe-Arg-AMC, HCl

Z-Phe-Arg-*p*NA, HCl

Hersteller

Sigma-Aldrich, #C6780

Bachem, #4030514

Zedira GmbH, #D005

Sigma-Aldrich, #L2023

NIPPON Genetics EUROPE, #MG03

Zedira GmbH, #D006

Zedira GmbH, #B002

Sigma-Aldrich, #C9801

LI-COR, # 927-40000

Bachem, #4012873

Zedira GmbH, #C001

Bachem, #4003379

Bachem, #4009170

2.1.8. Säulenmaterialien/Säulen

Säulenmaterialien/Säulen

Fragtogel EMD SO ₃ ⁻	Hersteller Merck, #116882
Fractogel EMD TMAE	Merck, #116881
HiTrap Capto Q, 1 ml	GE Healthcare, #11001302
Superdex 200 Increase 3.2/300	GE Healthcare, #29036232
Superdex 75 pg HiLoad 16/600	GE Healthcare, #28989333
Amberlite XAD-4	Sigma-Aldrich, #XAD4
Amberlite IR-120	Merck Millipore, #1.15966
Kieselgel-60	Macherey-Nagel, #815380
AmphiSpheres 40 RAM	Agilent Technologies, # PL3867
Uptisphere Strategy US5C18HQ-250/212 (250 × 21.2 mm, 5 µm, 100 Å)	Interchim, #US5C18HQ-250/212
VarioPrep VP 250/21 NUCLEOSIL 300-5 C18 (250 × 21 mm, 5 µm, 300 Å)	Macherey-Nagel, #715328.100
Synergi 4u Hydro-RP column (250 × 4.60 mm, 4 µm, 80 Å)	Phenomenex, #00G-4375-E0
Sunfire C18 (100 x 2.1 mm, 3.5 µm, 100 Å)	Waters Sunfire, #186002534
EC 250/4 Nucleodur 300-5 C4ec	Macherey-Nagel, #760196.40
EC 250/4 Nucleodur 300-5 C18ec	Macherey-Nagel, #760186.40

2.1.9. Kits

Kits

peqGeold Plasmid Miniprep Kit I	Hersteller peqlab, VWR, #12-6942-02
FastGene Gel/PCR Extraction Kit	NIPPON Genetics EUROPE, #FG-91202

2.1.10. Medien und Lösungen für mikro- und molekularbiologische Methoden

E. coli:

LB-Medium nach

Lennox:

10 g/l	Pepton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl

→ für die Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 1.5% (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

Autoinduktionsmedium

3.5 g/l	Glycerol
3.1 g/l	K ₂ HPO ₄
3.08 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
0.44 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
10 g/l	Pepton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl

→ Zugabe nach Autoklavieren, als sterile Stammlösung

0.45 g/l	D-Glukose x H ₂ O
1.2 g/l	Laktose x H ₂ O

TYM-Medium:

20 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
5.8 g/l	NaCl
2.46 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O

SOC-Medium:

20 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
0.5 g/l	NaCl
0.19 g/l	KCl

→ der pH-Wert wurde nach Lösen der Substanzen mit 5 M NaOH auf 7.0 eingestellt.

→ Zugabe nach Autoklavieren, als sterile Stammlösung

20 mM	D-Glukose
10 mM	MgCl ₂

TfB1-Puffer:

pH = 5.8

30 mM Kaliumacetat
100 mM KCl
10 mM CaCl₂
15% Glycerol (w/v)

→ Zugabe nach Autoklavieren, als sterile Stammlösung

50 mM MnCl₂**TfB2-Puffer:**

pH = 7.0

10 mM MOPS
10 mM KCl
75 mM CaCl₂
15% Glycerol (w/v)

Antibiotikallösungen:**Antibiotikum****Stammlösung****Endkonzentration**

Ampicillin

100 mg/ml in 50% EtOH

100 µg/ml

Chloramphenicol

34 mg/ml in 100% EtOH

34 µg/ml

Tetracyclin

25 mg/ml in 50% EtOH

50 µg/ml

S. mobaraensis*:*GYM-Medium:**

4 g/l D-Glukose
4 g/l Hefeextrakt
10 g/l Malzextrakt
2 g/l CaCO₃

→ der pH-Wert wurde nach Lösen der Substanzen mit 5 M NaOH auf
7.2 eingestellt.

Stärke-Mineralsalz-

Medium:	10 g/l	Stärke
	1 g/l	K_2HPO_4
	2 g/l	$(NH_4)_2SO_4$
	1 g/l	$MgSO_4 \times 7 H_2O$
	1 g/l	NaCl
	2 g/l	$CaCO_3$
	20 g/l	Pepton
	2 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	D-Glukose $\times H_2O$

→ für die Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 1.5% (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

Spurenelementlösung:	4 g/l	$CaCl_2 \times 2 H_2O$
	1 g/l	Fe(III)-Citrat $\times H_2O$
	0.2 g/l	$MnSO_4$
	0.1 g/l	$ZnCl_2$
	40 mg/l	$CuSO_4 \times 5 H_2O$
	30 mg/l	$CoCl_2 \times 6 H_2O$
	30 mg/l	$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$
	60 mg/l	$Na_2B_4O_7$

→ die Sterilisation erfolgte über einen 0.2 μm Filter.

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Sterilisation

Hitzestabiles Equipment und Flüssigkeiten wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Flüssigkeiten wurden über einen 0.2 μm Filter steril filtriert. Temperaturempfindliches Equipment sowie Arbeitsflächen wurden mit 70% (v/v) Isopropanol desinfiziert.

2.2.2. Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch (BioSpectrometer, Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) ermittelt. Ein Milliliter des jeweiligen Mediums diente als Referenz.

2.2.3. Kultivierung von *E. coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden unter aeroben Bedingungen für Standardanwendungen in LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator angezogen. Für die Plattenkultivierung wurde dem LB-Medium 1.5% Agar-Agar zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einem Brutschrank. Bei Plasmid-tragenden Zellen wurde das entsprechende Antibiotikum dem Medium zugesetzt.

Die rekombinante Produktion von Proteinvarianten erfolgte mit *E. coli* BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS. Zum *Inokulum* einer Vorkultur für die Submerskultivierung diente eine Einzelkolonie der mit dem Produktionsplasmid transformierten *E. coli*-Zellen. Die Kultivierung erfolgte schüttelnd in einem 250 ml Schikanekolben mit 100 ml LB-Medium in Gegenwart von Antibiotika bei 37 °C und 125 rpm über Nacht.

Für die Produktion rekombinanter SSTI- bzw. SPI-Varianten wurde 1 l LB-Medium in einem 2 l Schikanekolben mit einer Vorkultur zu einer OD₆₀₀ von 0.1 angeimpft und bei 125 rpm und 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 – 0.6 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion der rekombinanten Expression des Zielgens durch Zugabe von 1 mM IPTG bei 28 °C und 125 rpm für 5 h.

Die Produktion rekombinanter TAMP und proMTG fand in Autoinduktionsmedium statt. Hierzu wurde 1 l Autoinduktionsmedium in einem 2 l Schikanekolben mit einer Vorkultur zu einer OD₆₀₀ von 0.1 inokuliert und bei 28 °C und 125 rpm für 22 – 24 h schüttelnd inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Metabolisierung der im Medium enthaltenen Kohlenstoffquellen. Nach primärem Verbrauch der Glukose stellte sich der Stoffwechsel der Mikroorganismen auf die ebenfalls enthaltene Laktose um. Zur Überbrückung diente während dieser Umstellung Glycerol als C-Quelle. Nach erfolgreicher Umstellung des Stoffwechsels wird Laktose auch zu Galaktose umgebaut, die die Proteinexpression induziert.

2.2.4. Zellernte und Zellaufschluss von *E. coli* für die rekombinante Produktion

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Submerskultur bei 12,000 g und 4 °C für 10 min. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellsediment in ein 50 ml Reagiergefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Vor dem Zellaufschluss wurde das Zellsediment in 4 ml Aufschlusspuffer pro Gramm Sediment suspendiert. Nach Zugabe einer kleinen Menge DNase 1 erfolgten drei Ultraschallaufschlusszyklen auf Eis mit einer Dauer von jeweils 3 min und einer Amplitude von 25%. Zwischen den Durchgängen wurde jeweils 5 min pausiert, um ein Abkühlen der Lösung zu gewährleisten. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 20,000 g und 4 °C. Der Überstand wurde gesammelt, und das Sediment wurde im gleichen Volumen Puffer wie zuvor resuspendiert. Es erfolgte ein erneuter

Ultraschallaufschluss gefolgt von Zentrifugation. Beide Überstände wurden vereinigt und weiter aufgearbeitet. Eine etwaige Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM NaCl

2.2.5. Kultivierung von *Streptomyces mobaraensis*

Die Plattenkultivierung von *S. mobaraensis* erfolgte auf Glucose-Yeast-Malt-Medium (GYM) nach Shirling und Gottlieb (1966) mit einem Agar-Agar-Anteil von 1.5% (w/v). Mit einer Sporensuspension der DSMZ (Braunschweig) oder dem Luftmycel und den Sporen einer bereits bewachsenen Platte wurden die Platten beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C für ca. 30 d.

Zur Submerskultivierung von *S. mobaraensis* wurde das nach Korn-Wendisch und Kutzner (1981) modifizierte Stärke-Mineralsalz-Medium nach Shirling und Gottlieb (1966) verwendet. Dazu wurden 1 l Drei-Schikane-Kolben mit je 110 ml Nährmedium befüllt und 20 min bei 121 °C sterilisiert. Nach dem Autoklavieren erfolgte die sterile Zugabe von 1 ml Spurenelementlösung zu jedem Kolben. Zum Inokulieren der Medien diente ein ca. 1 cm² großes und ca. 30 d mit *S. mobaraensis* bewachsenes GYM-Agar-Stück. Es folgte eine 65-h-Kultivierung unter Stressbedingungen bei 42 °C und 100 rpm. Nach erfolgreicher Anzucht erfolgte die Abtrennung der Zellen vom Kultivierungsmedium über einen Büchnertrichter. Das Filtrat wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Bestimmung der DNA-Konzentration

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm an einem Spektrometer (BioSpectrometer, Eppendorf) gemessen. Eine Absorption von 1.0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA Proben wurde über das Verhältnis $A_{260/280}$ bestimmt. Ein Verhältnis von 1.7 – 2.0 entspricht DNA-Proben mit geringer Proteinverunreinigung.

2.3.2. Agarose Gelelektrophorese

Die Trennung, Analyse und Reinigung von DNA erfolgte mittels Elektrophorese in einem 1.5% TAE-Agarose-Gel. Dem Gel wurde *Midori Green* als Fluoreszenzfarbstoff für die DNA-Färbung zugesetzt. Die zu analysierenden DNA-Proben wurde mit einem Auftragspuffer (6-fach *Loading Dye*) versetzt und auf das Agarosegel in die Probentaschen aufgetragen. Vor dem Auftrag der Proben wurde das Gel in die Apparatur gesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Separation der DNA-Fragmente erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 110 – 130 V für 30 min. Die negativ geladene DNA wandert in dieser Zeit größenabhängig zur Kathode, kleine DNA-Moleküle schneller als große. Die Visualisierung

der DNA-Moleküle erfolgte anschließend durch Anregung des *Midori-Green*-Farbstoffs mit UV-Licht auf einem Unterlichttisch. Für die Identifikation der Größe von DNA-Fragmenten wurde ein Größenstandard mit DNA-Fragmenten definierter Länge mitgeführt (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fischer Scientific).

2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte die Anzucht von transformierten *E. coli* XL1-Blue-Zellen ü. N. bei 37 °C im 6 ml-Maßstab in Gegenwart von Selektionsmarkern. Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des „peqGold Plasmid Miniprep Kit I“ nach Herstellerprotokoll isoliert. Die DNA wurde dabei über polare Adsorption an Kieselgelsäulen im 2 ml-Maßstab gebunden, gereinigt und eluiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend sequenziert, ein *E. coli*-Produktionsstamm wurde transformiert, für die Proteinproduktion eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.3.4. DNA-Reinigung

Die Reinigung von DNA nach PCR und Restriktion sowie die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „FastGene Gel/PCR Extraction Kit“ nach Herstellerangaben. Die Reinigung basiert wie bei der Isolierung von Plasmid DNA auf der polaren Adsorption an Kieselgelsäulen. Die DNA wurde nach Reinigung weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

2.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt nach ihrer Einführung im Jahre 1986 durch Mullis *et al.* eine Standardmethode für die enzymatische Vervielfältigung von DNA und die Detektion geringer DNA-Mengen dar [97]. Des Weiteren ermöglicht diese Technik die Identifikation von Einzelkolonien nach einer Klonierung, die das gewünschte DNA-Fragment enthalten. Dazu werden Zellen eines Einzelklons an Stelle eines *Templates* in einem PCR-Ansatz mit den für das gesuchte Fragment spezifischen Oligonukleotiden überführt und die PCR nach Protokoll durchgeführt. Positive Klone zeigten nach Analytik der PCR eine signifikante Bande im Agarosegel auf der Höhe des gesuchten Fragments.

Ein typischer Ablauf für eine Gen-Amplifikation besteht aus der DNA-Denaturierung bei 96 – 98 °C, gefolgt von der Anlagerung spezifischer Oligonukleotide bei einer für die Oligonukleotide spezifischen Temperatur (45 – 68 °C) und der Elongation bei 72 °C. Diese Reaktionsschritte werden hintereinander für 25 – 30 Zyklen durchgeführt. Im Anschluss folgt die finale Elongation für 5 min bei 72 °C. Die Anlagerungstemperatur der spezifischen Oligonukleotide ist abhängig von der Länge sowie dem GC-Gehalt der Oligonukleotide. Sie wurde nach Gl. 1 berechnet.

Gleichung 1: $T_M = 4 \times (\text{Anzahl von G und C}) + 2 \times (\text{Anzahl von A und T})$

Für analytische Zwecke wurde die *Taq*-Polymerase aus eigener Produktion für präparative Ansätze die *Phusion*-DNA-Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Die *Phusion*-Polymerase weist eine 50-fach geringere Fehlerrate im Vergleich zur *Taq*-Polymerase auf.

Tabelle 1: Zusammensetzung einer PCR

Bestandteil	Volumen	Finale Konzentration
Nuklease-freies Wasser	auf 50 μ l	-
5-fach <i>Phusion</i> -HF-Puffer	10 μ l	1-fach
10 mM dNTPs	0.4 μ l	200 μ M
10 μ M <i>forward</i> -Primer	2.5 μ l	0.5 μ M
10 μ M <i>reverse</i> -Primer	2.5 μ l	0.5 μ M
Template-DNA	variabel	1 pg – 10 ng / 50 μ l PCR
Polymerase	0.5 μ l	1 Unit / 50 μ l PCR

Tabelle 2: Programm einer PCR für die Amplifikation von Genen

Schritt	Name	Zeit	Temperatur
1	Initiale Denaturierung	30 s	98 °C
2	Denaturierung	5 – 10 s	98 °C
3	<i>Annealing</i>	10 – 30 s	45 – 72 °C
4	Elongation	15 – 30 s pro kb ¹ 60 s pro kb ²	72 °C
5	Finale Elongation	5 – 10 min	72 °C
6	Lagerung	∞	4 °C

¹ *Phusion*-Polymerase, NEB; ² *Taq*-Polymerase, h_da; Schritte 2 – 4 werden 29-mal durchlaufen

2.3.6. Size-overlap-extension-PCR

Für die gezielte Substitution einzelner Aminosäuren in einem Protein wurden mittels *Size-overlap-extension*-PCR (SOE) spezifische Codons in einem Zielgen ausgetauscht. Diese Methode wurde angelehnt an Bryksin und Matsumura (2010) durchgeführt [98]. Dazu wurden zwei gegenläufige *Primer* verwendet, welche die gewünschte Mutation trugen und ca. 15 Basen vor und nach der zu verändernden Basen-Sequenz an das Template binden. Neben den die Mutation tragenden *Primern* wurden zwei weitere gegenläufige *Primer* verwendet, welche an Segmente *up*- und *downstream* vom Zielgen binden. In einer ersten PCR wurde mittels des *upstream*-vorgelagerten *Primers* und des dazu gegenläufigen Mutagenese-*Primers* sowie des zweiten Mutagenese-*Primers* und dem Zielgen *downstream*-nachgelagerten *Primers* die Mutation eingeführt. Nach Reinigung der PCR-Produkte

wurden diese in einer zweiten PCR vereinigt und als *Template*-DNA eingesetzt. Die Verwendung der *up*- und *downstream-Primer* führte zur Fusion beider DNA Fragmente. Dabei dient der Bereich, an den die *Mutagenese-Primer* binden, als *Annealing*-Bereich. Nach anschließender Restriktion des zweiten PCR-Produkts und Ligation in einen analog hydrolysierten Vektor erfolgte die Transformation von *E.-coli*-Zellen mit dem generierten Plasmid.

Die *Annealing*-Temperatur der *Mutagenese-Primer* ist vom GC-Gehalt, deren Länge und dem *Mismatch*-Anteil abhängig. Sie wurde so gewählt, dass sie 5 °C unter dem T_M -Wert der *Primer* lag. Dieser wurde mit Gl. 2 berechnet, wobei N für die Länge der *Primer* in Basen steht:

$$\text{Gleichung 2: } T_M = 81.5 + 0.41 (\text{GC-Gehalt in \%}) - (675 / N) - (\text{Mismatch-Anteil in \%})$$

Die PCR erfolgte wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben.

2.3.7. DNA-Restriktion

Restriktions-Endonukleasen hydrolysieren DNA an einer für sie spezifischen Sequenz. Dabei erkennen sie abhängig von ihrer Spezifität vier bis acht Basenpaare eines DNA-Strangs. Bei molekularbiologischen Methoden werden häufig Endonukleasen des Typs II verwendet. Diese erkennen vier bis sechs Basenpaare einer palindromischen Sequenz. Abhängig von ihrer enzymatischen Spezifität entstehen bei der Hydrolyse *blunt* oder *sticky ends* am 3'- und 5'-Ende des DNA-Strangs. Die Hydrolyse gereinigter PCR-Produkte und Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben der jeweiligen Enzyme bei 37 °C für 1 – 2 h. Anschließend erfolgte die Reinigung der DNA mit dem „FastGene Gel/PCR Extraction Kit“.

2.3.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von kompatibel hydrolysierten DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) verwendet. Standardisiert erfolgte die Ligation von 1 ng hydrolysierter Vektor-DNA und Insert-DNA im 5-fachen molaren Überschuss. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben bei 22 °C für 10 min. Im Anschluss wurden 5 µl des Ligationsansatzes für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* XL1-Blue eingesetzt.

2.3.9. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Donor-DNA wurde die CaCl_2 -Methode in Anlehnung an das Protokoll von Inoue *et al.* verwendet [99]. Grundlage für diese Transformationstechnik ist die Beobachtung, dass ein Überschuss an Ca^{2+} -Ionen die Durchlässigkeit der Zellmembran von *E. coli* erhöht und somit die Aufnahme von Fremd-DNA ermöglicht. Der genaue Mechanismus ist bis dato nicht bekannt. Jedoch schirmen die Ca^{2+} -Ionen die negativen Ladungen der Zelloberfläche sowie des Phosphatrückgrats der DNA ab, wodurch eine Adsorption der DNA an die Zelloberfläche ermöglicht wird. Alle Arbeiten erfolgten mit sterilen Reagenzien und Materialien nach folgendem Schema:

Kultivierung einer 5 ml Vorkultur bei 37 °C ü. N.
Inokulation von 250 ml TYM-Medium in 1 l-Schikanekolben mit der Vorkultur und Inkubation bei 37 °C und 120 rpm bis zu einer OD_{600} von 0.5 – 0.6
Zentrifugation bei 4 °C, 15 min, 2,000 g
Pellet in 50 ml kaltem Tfb1-Puffer resuspendieren
Zentrifugation bei 4 °C, 15 min, 2,000 g
Pellet in 50 ml kaltem Tfb2-Puffer resuspendieren
Aliquotieren je 50 μl
Frieren mit flüssigem Stickstoff
Lagerung bei -80 °C

2.3.10. Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA und die rekombinante Proteinproduktion in *E. coli* wurde die Hitzeschock-Transformationsmethode nach Froger und Hall (2007) angewandt [100]. Durch Präinkubation chemisch kompetenter *E.-coli*-Zellen mit Plasmid-DNA auf Eis erfolgte die Anlagerung der DNA-Moleküle auf der Zelloberfläche. Die Aufnahme der DNA wurde durch kurzzeitigen Hitzeschock und Abkühlung der Zellen auf Eis ermöglicht. Transformierte *E.-coli*-Zellen wurden anschließend auf ihre jeweilige Antibiotikaresistenz selektiert. Die Transformation erfolgte nach folgendem Schema:

Auftauen kompetenter <i>E. coli</i> Zellen (50 μl) auf Eis
Zugabe von 1 μl Plasmid-DNA bzw. 5 μl Ligationsansatz
Inkubation für 30 min auf Eis
Hitzeschock für 30 s im Wasserbad bei 42 °C
Abkühlen der Zellen auf Eis für 3 min
Zugabe von 250 μl lauwarmen SOC-Mediums
Regeneration der Zellen für 60 min bei 37 °C und 700 rpm
Ausplattieren von 50 μl auf LB-Agar-Platte mit Selektionsmarker
Inkubation bei 37 °C ü. N.

2.3.11. Sequenzierung von Plasmid-DNA

DNA-Sequenzierungen von Plasmid-DNA oder mittels PCR erzeugter DNA wurde von dem Sequenzierungsservice der Ludwig-Maximilian-Universität München (LMU) nach dem Protokoll „Cycle, Clean & Run (BigDye v3.1)“ durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde der zu sequenzierenden DNA 3.2 pmol eines Sequenzierungs-Primers in einem Gesamtvolumen von 7 μ l zugesetzt. Die generierten Ergebnisdateien wurde mit dem Programm SnapGene (Version 2.3.2, GSL Biotech LLC) ausgewertet und mit der erwarteten DNA-Sequenz abgeglichen.

Sequenzierungspuffer: 10 mM Tris HCl pH 8.5

2.4. Reinigung von Proteinen

2.4.1. Fraktionierende Ethanol-Fällung

Lösungsmittel wie Aceton, Methanol oder Ethanol können zur fraktionierenden Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen verwendet werden. Diese Lösungsmittel sind mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar und setzen durch ihre niedrige Dielektrizitätskonstante die Solvatationskraft wässriger Lösungen für Proteine herab. Für die Produktion von MTG aus *S. mobaraensis* wurde die Fällung mit Ethanol verwendet.

Nach Filtration der Kulturbrühe (Abschnitt 2.2.5) über einen Büchnertrichter erfolgte auf Eis unter Rühren die Zugabe von eisgekühltem Ethanol bis zu einer Konzentration von 30%. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurden präzipitierte Proteine mittels Zentrifugation (13,000 g, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Das Präzipitat wurde verworfen und dem Überstand erneut Ethanol bis zu einer finalen Konzentration von 50% zugetropft. Nach Inkubation auf Eis für 30 min erfolgte die Zentrifugation. Das Zielprotein (MTG) befand sich danach im Präzipitat. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 50 mM Na Citrat pH 6.0 aufgenommen und ü. N. bei 4 °C gelagert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand für eine IAC (Abschnitt 2.4.3) verwendet, um weitere Proteine abzutrennen.

2.4.2. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die IMAC ist eine effiziente Methode für die Reinigung von rekombinant modifizierten Proteinen, an die ein Hexahistidin-Affinitäts-Tag (6xHis-Tag) fusioniert wurde. Als Säulenmatrix diente Nitrilotriessigsäure (NTA), welche kovalent an ein Trägermaterial (bspw. Sepharose) gekoppelt war. NTA ist ein Metall-gelierendes Reagenz und bildet stabile Komplexe mit zweiwertigen Ionen wie Ni^{2+} . Gleichmaßen komplexieren die Imidazolringe von Histidinen das Ni^{2+} , was zu einer stabilen Immobilisierung Histidin-reicher sowie mit einem 6xHis-Tag versehener Proteine führt. Die IMAC

wurde an BioLogic-LP-Anlagen (Biorad) mit 1 ml/min bzw. 4 ml/min an HisTrap™-HP-Säulen (GE Healthcare) im 1-ml- bzw. 5-ml-Maßstab durchgeführt. Nach Zelllyse und Abtrennung der Zellfragmente wurde das steril-filtrierte Zelllysate auf die Säule geladen und nicht-bindende Proteine durch Waschen mit 5 bis 10 Säulenvolumen Bindepuffer entfernt. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit linear oder stufenweise steigenden Imidazol-Konzentrationen. Die Reinheit der Proben wurde mittels SDS-PAGE wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben ermittelt. Fraktionen mit hoher Reinheit wurden vereinigt und gegen Bindepuffer dialysiert. Es erfolgte die Lagerung bei 4 °C bis zur weiteren Aufarbeitung.

Bindepuffer: 50 mM Tris HCl pH 8.0, 300 mM NaCl

Elutionspuffer: 50 mM Tris HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol

2.4.3. Ionenaustauschchromatographie (IAC)

Die IAC ist eine Form der Flüssig-Fest-Chromatographie die auf der reversiblen Ausbildung heteropolarer Bindungen zwischen den an die Matrix des Ionenaustauschers gebundenen Festionen und den mobilen Gegenionen basiert. Passiert ein ionisches Gemisch eine Ionenaustauscher-Säule, erfolgt keine Bindung neutraler Moleküle oder Ionen gleicher Ladung wie die der Festionen. Wohingegen die den Festionen entgegengesetzt geladenen Spezies mit den Gegenionen um die Bindungsplätze konkurrieren. Proteine mit höherer Ladung als die Gegenionen binden die Festionen und werden zurückgehalten. Es kommt zur Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit ihrer Oberflächenladung. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mittels linear oder stufenweise steigender NaCl-Konzentration. Der pH-Wert des Puffersystems wurde in Abhängigkeit des theoretischen pI-Wertes des zu reinigenden Proteins gewählt (Tabelle 3). Die Beurteilung der Reinheit einzelner Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben. Fraktionen mit hoher Reinheit wurden vereinigt. Es erfolgte die Lagerung bei 4 °C bis zur weiteren Aufarbeitung. Bei längerfristiger Lagerung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Tabelle 3: IAC-Säulen- und Pufferbedingungen

Protein	Säule	Puffer
SPI (<i>S. mob</i>)	Fragtogel EMD SO ₃ ⁻ (Merck), 3 ml bzw. 30 ml	Bindung: 50 mM Na Acetat pH 4.0
SSTI (<i>S. mob</i>)	Fractogel EMD TMAE (Merck), 30 ml	Elution: 50 mM Na Acetat pH 4.0, 1 M NaCl
MTG (<i>S. mob</i>) rek. proMTG	Fragtogel EMD SO ₃ ⁻ (Merck), 30 ml	Bindung: 50 mM Na Citrat pH 6.0 Elution: 50 mM Na Citrat pH 6.0, 1 M NaCl
rek. SPI _p	Fragtogel EMD SO ₃ ⁻ , 3 ml bzw. 30 ml	Bindung: 50 mM Na Acetat pH 5.3
rek. SSTI	(Merck)	Elution: 50 mM Na Acetat pH 5.3, 1 M NaCl
rek. TAMP	HiTrap Capto Q, 1 ml (GE Healthcare)	Bindung: 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM CaCl ₂ Elution: 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM CaCl ₂ , 1 M NaCl

2.4.4. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Bei der GPC beruht die Reinigung von Proteinen auf der Trennung nach ihrer Größe entlang einer Matrix. Kleine Moleküle dringen in die Poren des Säulenmaterials ein und können sich innerhalb der Poren nur noch durch Diffusion fortbewegen, wodurch eine Verzögerung der Elution erfolgt. Große Moleküle hingegen können nicht in die Poren eindringen, durchlaufen die Matrix in Kanälen zwischen den Gelpartikeln und eluieren entsprechend am schnellsten. Die GPC diente neben der Abtrennung von Verunreinigungen während der Proteinreinigung auch zur Umpufferung von Proteinproben bspw. für die ITC (Abschnitt 2.6.7).

Zur Anwendung kam für den analytischen Maßstab eine Superdex 200 *Increase* 3.2/300-Säule (GE Healthcare) und für den präparativen Maßstab eine Superdex 75 *pg HiLoad* 16/600-Säule (GE Healthcare). Die Chromatographie erfolgte für analytische Anwendungen an einer Agilent Series-1200 mit 75 µl/min und für die präparative Reinigung an einer ÄKTAprime plus (GE Healthcare) Anlage mit einer Flussrate von 1 ml/min. Der verwendete Puffer richtete sich nach dem zu reinigenden Protein und ist in Tabelle 4 aufgeführt. Nach Beurteilung der Reinheit der Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren, anschließend bei -80 °C gelagert oder lyophilisiert.

Tabelle 4: Pufferbedingungen für die GPC

Protein	Puffer
SPI _p (<i>S. mob</i>), rek. SPI _p , SSTI (<i>S. mob</i>), rek. SSTI	50 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM NaCl
rek. TAMP, SSTI (<i>S. mob</i>), rek. SSTI	20 mM Hepes NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl
MTG (<i>S. mob</i>), rek. proMTG	20 mM Na Citrat pH 6.0, 150 mM NaCl

2.4.5. Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse wurde verwendet, um die Puffersubstanz auszutauschen und die Abtrennung von unerwünschten niedermolekularen Substanzen zu bewerkstelligen. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Diffusion durch eine semipermeable Membran mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 3.5 kDa. Die molekulare Ausschlussgrenze beschreibt die minimale Größe der Moleküle, welche durch die Membran zurückgehalten werden. Kleinere Moleküle und/oder Ionen können die Membran abhängig von ihrem Konzentrationsgradienten passieren. Proteinlösungen wurden in einen Dialyseschlauch gefüllt und die Membran mit 2 Dialyseklammern verschlossen. Die Dialyse erfolgte gegen 3 – 5 l Puffer bei 4 °C ü. N.

2.4.6. Konzentrierung von Proteinlösungen

Für die Konzentrierung von Proteinproben wurden Zentrifugationseinheiten (Vivaspin 2 #VS2011 und Vivaspin 20 #VS2011, Sartorius) genutzt, die eine Membran aus Polyethersulfon mit einer definierten molekularen Ausschlussgrenze besitzen. Die Konzentrierung erfolgte nach Herstellerprotokoll in einer Zentrifuge bei 4,000 g und 4 °C bis zur gewünschten Konzentration.

2.5. Reinigung von SPI_{ac}

2.5.1. Negative Kationen- und Anionenaustauschchromatographie von SPI_{ac}

Mittels Kationen- und Anionenaustauschchromatographie (IAC) wurden Proteine und geladene Verunreinigungen aus SPI_{ac}-haltigem zellfreiem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* (Abschnitt 2.2.5) abgetrennt. Die zu reinigende Substanz wurde dabei nicht oder nur in geringen Mengen an das verwendete Säulenmaterial gebunden und befand sich im nicht-bindenden Durchlauf der Chromatographie. Für SPI_{ac} kamen zwei 30 ml Säulen mit starken Ionenaustauscherharzen (Fractogel EMD SO₃⁻, Fractogel EMD TMAE, Merck) zum Einsatz. Zum einen adsorbierten Sulfatgruppen von Fractogel EMD SO₃⁻ positiv geladene Substanzen und Proteine, zum anderen Trimethylammonium-methylfunktionen des Fractogel EMD TMAE negativ geladene Verunreinigungen. Als Puffersystem wurde ein 50 mM Na Acetat Puffer pH 4.0 gewählt. Bei diesem pH-Wert interagierten vornehmlich Proteine mit Fractogel EMD SO₃⁻ (MTG, DAIP, SSTI und SPI_p).

Vor dem Auftrag der Kulturbrühe auf die IAC-Säulen erfolgte deren Ansäuerung mit Eisessig auf einen pH-Wert von 4.0. Nach anschließender Zentrifugation (12,000 g, 10 min, RT) diente sie als Auftrag für die folgende IAC. Die Durchführung erfolgte an Biorad-Anlagen mit einer Flussrate von 2 ml/min. Nach Equilibrierung der hintereinander geschalteten Säulen mit dem Laufpuffer erfolgte der Auftrag der zellfreien Kulturbrühe. Der Durchlauf wurde gesammelt und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Gebundene Verunreinigungen wurden anschließend mit einem linearen Salzgradienten

(50 mM Na Acetat Puffer pH 4.0, 1 M NaCl) eluiert. Proteine wurden als Nebenprodukt bei entsprechender Reinheit bei -20 °C gelagert.

2.5.2. Hydrophobe Extraktion von SPI_{ac}

Für die Extraktion von SPI_{ac} aus wässrigen Lösungen wurde die Bindung der Substanz an hydrophobe Trägerharze genutzt. Vorversuchen ergaben eine hohe Affinität von SPI_{ac} zu Amberlite XAD-4 (Sigma-Aldrich). Dabei handelt es sich um ein hydrophobes, polyaromatisches Kunststoffharz, welches in der pharmazeutischen Industrie für die Isolierung kleiner aktiver Substanzen genutzt wird.

Es erfolgte die Zugabe von ca. 100 g Amberlite XAD-4 zu 1 l durch IAC vorgereinigter Kulturbühe (Abschnitt 2.5.1). Nach Inkubation auf einem Rollinkubator ü. N. bei 4 °C wurden nicht-bindende Bestandteile durch Filtration mittels Glasfritte abgetrennt. Das zurückgehaltene Amberlite XAD-4-Material wurde viermal mit 30%igem MeOH gewaschen, und anschließend wurden gebundene Substanzen mit reinem MeOH eluiert. Die Abtrennung des MeOH erfolgte mittels Rotationsverdampfer (Abschnitt 2.5.6). Das erhaltene Konzentrat wurde bei 4 °C gelagert und durch kationische Extraktion weiter aufgearbeitet.

Amberlite XAD-4 wurde ebenfalls zur Extraktion des SPI_{ac} aus Elutionsfraktionen der IR-120-Chromatographie (Abschnitt 2.5.3) genutzt. Dazu wurden ca. 200 g Amberlite XAD-4 zu 1 l Eluat gegeben und für 1 h rollend bei 4 °C inkubiert. Die Abtrennung des Materials erfolgte über eine Glasfritte. Nach dreimaligem Waschen wurde der SPI_{ac} in drei Schritten mit je 200 ml reinem MeOH vom Material eluiert. Anschließend erfolgte die Einengung der Substanz mittels Rotationsverdampfer. Die auf ca. 10 ml eingeeugte Fraktion wurde durch Zugabe von 40 ml Wasser verdünnt, bei -80 °C eingefroren und durch Lyophilisation getrocknet. Die so erhaltenen Proben konnten bei Raumtemperatur stabil gelagert werden.

2.5.3. Kationische Extraktion von SPI_{ac}

SPI_{ac} zeigte in Vorversuchen Bindung an kationische Trägermaterialien bei saurem pH-Wert. Das beste Bindungs- und Elutionsverhalten wurde für Amberlite IR-120 (Merck Millipore, #1.15966) ermittelt. Amberlite IR-120 ist ein Styrol-Divinylbenzol-Copolymer mit Sulfonatgruppen. Es ist ein stark saures Kationenaustauscherharz und findet Anwendung in der Reinigung und Bindung von Aminosäuren bei saurem pH.

Die Extraktion des SPI_{ac} erfolgte als Säulenchromatographie in einer XK-Säule (400 x 30 mm) von GE Healthcare mit ca. 200 ml Amberlite IR-120 als Austauscherharz, an der Äkta Prime plus (GE Healthcare) mit einer Flussrate von 5 ml/min. Im Anschluss an den Auftrag des Amberlite XAD-4-Extraktes aus vorgereinigter Kulturbühe (Abschnitt 2.5.1) erfolgte das Waschen des Säulenmaterials bis zur A₂₈₀-Basislinie mit Waschpuffer. Anschließend wurden Verunreinigungen mit leichten ionischen

Wechselwirkungen durch Waschen mit einem Säulenvolumen (SV) Hochsalzpuffer entfernt. Nach erneutem Zwischenspülen mit einem SV Waschpuffer folgte die Entfernung von hydrophoben Verunreinigungen durch Spülen der Säule mit einem SV MeOH-Puffer. Nach zusätzlichem Spülen mit einem SV Waschpuffer erfolgte die Elution des SPI_{ac} durch Anheben des pH-Wertes auf 12 durch Spülen der Säule mit 2.5 SV Elutionspuffer. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden basierend auf ihren inhibitorischen Aktivitäten gegenüber Papain vereinigt und mittels Amberlite XAD-4 der enthaltene SPI_{ac} extrahiert (Abschnitt 2.5.2).

Waschpuffer:	20 mM Na Acetat pH 4.0
Hochsalzpuffer:	20 mM Na Acetat pH 4.0, 3 M NaCl
MeOH-Puffer:	20 mM Na Acetat pH 4.0, 70 % MeOH
Elutionspuffer:	20 mM KCl NaOH pH 12.0

2.5.4. Säulenchromatographie von SPI_{ac}

Die Säulenchromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem sich die stationäre Phase in einem zylindrischen Rohr, der Trennsäule, befindet. Die Trennung beruht auf der unterschiedlich starken Adsorption der Substanzen in Lösung (der mobilen Phase) an einen festen Träger (der stationären Phase). Diese Technik ermöglicht die Reinigung von Stoffgemischen unterschiedlicher Polarität im µg- bis kg-Maßstab.

Zum Einsatz kam eine 600 x 30 mm Chromatographiesäule aus Glas mit PTFE-Hahn (Kobe). Diese wurde mit Kieselgel-60 (Macherey-Nagel, #815380) flüssig unter Beaufschlagung von Druckluft befüllt. Das Kieselbett wurde nach Packung mit Seesand überschichtet, und die gelöste Probe wurde aufgetragen. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus MeOH und CH₂Cl₂ im Verhältnis 70:30. Die Elution der gewünschten Substanzen erfolgte durch Zugabe von ca. 1.5 l mobiler Phase. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 15 ml große Fraktionen unterteilt. Diese wurden auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber Papain untersucht und vereinigt. Anschließend erfolgte die Abtrennung des Lösungsmittels und Einengung wie in Abschnitt 2.5.6 beschrieben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mittels präparativer HPLC (Abschnitt 2.5.5).

2.5.5. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) dient der chromatographischen Trennung von Stoffgemischen im präparativen und analytischen Maßstab. Die Detektion eluierender Substanzen erfolgte in der Regel bei 220 und 280 nm. Es kamen unterschiedliche Systeme für die präparative HPLC zur Anwendung wie in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Aufbau der präparativen HPLC

Probe	Anlage	Säule	Eluenten
Peptide: IP1, IP2, IP3	Interchim puriFlash® 4250	Uptisphere Strategy US5C18HQ-250/212 (250 × 21.2 mm, 5 µm, 100 Å)	A: Wasser mit 0.1% Trifluoressigsäure B: 90% Acetonitril mit 0.1% Trifluoressigsäure
SPI _{ac} : AC1, AC2	Agilent 1260 Infinity	VarioPrep VP 250/21 NUCLEOSIL 300-5 C18 (250 × 21 mm, 5 µm, 300 Å)	A: Wasser mit 0.1% Trifluoressigsäure B: Acetonitril mit 0.1% Trifluoressigsäure

2.5.6. Entfernung organischer Lösungsmittel

Die Abtrennung von organischen Lösungsmitteln erfolgte mit einem Rotationsverdampfer. Dabei wird die Oberfläche durch Rotation der Lösung vergrößert, und die Temperatur wird gezielt durch ein Wasserbad für das zu entfernende Lösungsmittel eingestellt. Das Lösungsmittel wurde bei Unterdruck abgezogen und durch einen Kühler abdestilliert.

2.5.7. Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung (Lyophilisation) beruht auf dem physikalischen Prozess der Sublimation. Dabei sublimiert Wasser in gefrorenen Proben ohne zwischenzeitliches Auftauen direkt in die Gasphase. Das Endprodukt sind wasserreduzierte Proben, das Lyophilisat. Die Gefriertrocknung wurde genutzt, um Proben für längere Lagerungen zu stabilisieren oder um Wasser aus den Proben zu entfernen. Hierzu wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und in der ALPHA 1-4 LSC (Christ) bis zu einem Pulver lyophilisiert. Die Stellfläche der Proben wurde auf -20 °C und der Kondensator auf -60 °C bei einem Vakuum von 0.016 mbar im Probenraum temperiert.

2.6. Analytische Methoden

2.6.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte die Messung der Absorption der Proteinlösung bei 280 nm und die Berechnung des theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten. Die molare Masse so wie der molare Extinktionskoeffizient wurden mit Hilfe von *Expasy ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) [101] durch Angabe der Primärsequenz bestimmt. Nach dem Gesetz von Lambert und Beer (Gl. 3) erfolgte anschließend die Berechnung der Proteinkonzentration.

Gleichung 3: $A_{280} = \epsilon \cdot c \cdot d$

ϵ = Extinktionskoeffizient

c = Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz

d = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

2.6.2. Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erlaubt die Separation von Proteinen in einem elektrischen Feld abhängig von ihrem Molekulargewicht durch die Verwendung des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS). Es entfaltet, linearisiert und bindet an Proteine und sorgt so für eine einheitlich negative Ladung, was eine Auftrennung nach Proteingröße ermöglicht. Die Trennung der Proteine erfolgt in einem Polyacrylamidgel. Die Eigenschaften des Gels werden durch die gewählte Konzentration an Acrylamid bestimmt. Je höher die Acrylamidkonzentration desto höher die Quervernetzung und die Auflösung in Bereichen von Proteinen mit geringerem Molekulargewicht.

Diese Methode wurde angelehnt an das Protokoll von Laemmli (1970) [102] durchgeführt und fand Anwendung bei der Bestimmung der Reinheit einer Probe, der Lokalisierung von Proteinen und der Bestimmung des apparenten Molekulargewichts eines Proteins. Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurde auf eine Spur jedes Gels ein Größenstandard mit Proteinen definierter Molmassen aufgetragen.

Für die Probenvorbereitung wurde 1/5 eines 5-fachen Auftragspuffers zu jeder Proteinprobe gegeben und die Proben bei 95 °C 5 – 10 min gekocht. Je nach Anwendung wurde ein Puffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol verwendet. β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken von Proteinen und führt so zu deren Linearisierung. Für Proben mit Metalloproteasen wurde dem 5-fachen Auftragspuffer 50 mM EDTA zugesetzt, um eine Autoproteolyse von Metalloproteasen beim Denaturierungsprozess zu verhindern. Anschließend wurden die Proben auf ein in eine Elektrophoresekammer (Biorad) eingespanntes und mit Puffer überschichtetes SDS-Gel geladen. Die Trennung erfolgte bei einer

Spannung von 200 V für 40 min. In dieser Arbeit wurden Gele mit 12.5% und 15% (w/v) Acrylamid-Anteil verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung eines 12.5 bzw. 15%igen SDS-Gel

Lösung	Sammelgel ¹	Trenngel 12.5% (w/v) ¹	Trenngel 15% (w/v) ¹
30% (w/v) Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid	4 ml	30 ml	35 ml
1 M Tris-HCl, pH 8.9	-	27 ml	27 ml
1 M Tris-HCl, pH 6.8	3 ml	-	-
Wasser	16.5 ml	13.2 ml	7.6 ml
20% SDS-Lösung (w/v)	120 µl	360 µl	360 µl
TEMED	30 µl	60 µl	60 µl
10% APS-Lösung	300 µl	600 µl	300 µl

¹ Volumina sind für 12 Gele berechnet

Die Detektion der Proben erfolgte nach Auftrennung durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (Abschnitt 2.6.5) bzw. Protein-Blotting (Abschnitt 2.6.15).

5-fach SDS Ladepuffer: 250 mM Tris HCl pH 6.8, 10% SDS, 50% Glycerol, 0.1% Bromphenol-Blau, ± 5% β-Mercaptoethanol

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris HCl pH 8.9, 192 mM Glycin, 0.1% SDS

2.6.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der isoelektrischen Fokussierung erfolgt die elektrophoretische Trennung von Proteinen aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Aminosäureresten entlang eines pH-Gradienten. Die Wanderung im elektrischen Feld endet am isoelektrischen Punkt eines jeden Proteins. An diesem Punkt ist die Summe aller Ladungen der Aminosäureseitenketten null, sodass die Elektroden keine Anziehungskraft mehr ausüben.

Der isoelektrische Punkt von Proteinen wurde in einem vertikalen Gelsystem der Firma SERVA bestimmt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte auf SERVAGel IEF 3-10 Gelen nach Herstellerangaben (SERVA). Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung bei 50 V (60 min), 200 V (60 min) und abschließend 500 V (30 min) erfolgte die Färbung der Proteinbanden mit Coomassie-Brilliant-Blau wie in Abschnitt 2.6.5 beschrieben.

2.6.4. Zymographie

Die Zymographie ist eine Technik zum Nachweis enzymatischer Aktivität von Metalloproteasen nach Auftrennung in einer modifizierten SDS-PAGE [103, 104]. Für den Nachweis der Enzymaktivität einer Metalloprotease wird ein geeignetes Substrat (Rindercasein) in ein Polyacrylamidgel eingebaut. Die Elektrophorese wird unter milderen Bedingungen im Vergleich zur klassischen SDS-PAGE durchgeführt, um die Protease nicht irreversibel zu schädigen. Durch Auswaschung des enthaltenen SDS und Renaturierung der Protease wird das Substrat durch die Inkubation unter geeigneten Bedingungen proteolytisch abgebaut. Nach einer Coomassie-Färbung erscheinen ungefärbte Banden an den Stellen von Proteinen mit proteolytischer Aktivität, während der Hintergrund durch Anfärbung des eingebauten Proteinsubstrates angefärbt wird. Die verwendete Methode wurde in Anlehnung an Lantz und Ciborowski (1994), Raser *et al.* (1995), Snoek-van Beurden und Von den Hoff (2005), Troeberg und Nagase (2004) und Zotzel (2002) weiterentwickelt [105-109].

Die Durchführung erfolgte angelehnt an die SDS-PAGE (Abschnitt 2.6.2). Dem Trenngel wurden 0.3% (w/v) Rindercasein (Merck) bei der Herstellung zugesetzt. Zur Probenvorbereitung wurden die Proben, wie unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben, direkt auf das Gel aufgetragen und nicht erhitzt. Die Auftrennung erfolgte weiter nach dem Protokoll der SDS-PAGE bei 4 °C. Im Anschluss wurde das SDS-Gel kurz in Wasser geschwenkt und 3 h in Renaturierungspuffer mit dreimaligen Pufferwechsel inkubiert. Für den proteolytischen Abbau des Caseins wurde das Gel für 16 – 18 h bei 37 °C in Proteolysepuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Visualisierung mittels Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.6.5).

Renaturierungspuffer:	25 mM Tris pH 8.3, 100 mM Glycin, 2.5% (v/v) Triton X-100
Proteolysepuffer:	25 mM Tris pH 8.3, 100 mM Glycin, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM ZnCl ₂

2.6.5. Coomassie Färbung von SDS-Gelen

SDS-PAGE-Gele wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 und G-250 gefärbt, um Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Färbung basiert auf der Adsorption der Farbstoffe an basische Seitenketten eines Proteins. Dafür wurden die Gele nach der SDS-PAGE mit Coomassie-Färbelösung überschichtet, in der Mikrowelle erhitzt und 5 min auf einem Querschüttler inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte mit 10% Essigsäure (v/v) ebenfalls durch Erhitzen in einer Mikrowelle und Inkubation auf einem Querschüttler. Durch Anregung der Coomassie-Farbstoffe bei 685 nm und Detektion des emittierenden Lichts bei 700 nm erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden mittels Fluoreszenzbettscanner *Odyssey Sa* (LI-COR Biosciences).

Färbelösung: 0.2% Coomassie Brilliant Blau R-250, 0.2% Coomassie-Brilliant-Blau G-250, 50% Methanol, 7.5% Essigsäure

2.6.6. Schmelzpunktbestimmung mittels intrinsischer Fluoreszenz

Die Bestimmung des Schmelzpunkts von Proteinen erfolgte durch die Messung der intrinsischen Fluoreszenz bei 330 nm und 350 nm nach Anregung mit 280 nm mittels *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF)[110]. Durch Erwärmen der Proteine ändert sich die Mikroumgebung der Tryptophan- und Tyrosinseitenketten und führt zur Änderung der Fluoreszenzintensität bei 330 nm und 350 nm, deren Verhältnis ein Maß für den Denaturierungsgrad ist [111]. In unpolarer Umgebung, beispielsweise bei einer nativen Proteinkonformation im Proteininneren, emittiert das Tryptophan-Indol-Ringsystem bei ca. 330 nm. Nach einer Entfaltung und einer Erhöhung des räumlichen Kontaktes mit dem hydrophilen Puffersystem verschiebt sich die Emission in Richtung 350 nm. Das Verhältnis der Emissionswellenlängen wird gegen die Temperatur aufgetragen und ermöglicht die Bestimmung des Schmelzpunktes über den Wendepunkt der Kurve. Der Entfaltungsstartpunkt wird als T_{Onset} bezeichnet [110].

Tabelle 7: Bedingungen der Schmelzpunktbestimmung von Proteinen

Bauteil/Bedingungen	Bemerkung/Zusammensetzung
Messgerät	Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies), AG Fessner, TU Darmstadt
Kapillaren	nanoDSF Standard Capillaries (NanoTemper Technologies, #PR-C002)
Temperaturbereich	25 bis 95 °C
Heizrate	1 °C/min
Proben	0.1 bis 2 mg/ml Protein in Puffer

2.6.7. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Für die thermodynamische Bestimmung und Beschreibung von Protein-Protein bzw. Protein-Peptid Interaktionen wurde die ITC eingesetzt. Dieses Verfahren misst die Wärmedifferenz (q) in einem definierten Reaktionsraum, die nach Zugabe (i) eines Bindungspartners (Liganden) entsteht. Diese Wärmedifferenz kann graphisch nach Auftragung der benötigten Energie pro Zeiteinheit durch Integration der *Peak*-Flächen bestimmt werden. Dies erfolgt nach Gl. 4.

Gleichung 4: $\Delta q_{i,app} = \Delta m_{gebunden} * \text{Volumen}_{\text{Reaktionsraum}} * \Delta H_{app} = N * \Delta H_{app}$

Diese Formel ermöglicht auch die Berechnung der Bindungsenthalpie (ΔH) [112]. Die Bindungsaffinität (K_A) und der Bindungsstöchiometriefaktor (N) lassen sich nach Auftragung der Bindungsenthalpie gegen das molare Verhältnis der Bindungspartner aus der Steigung und dem Wendepunkt bestimmen. Durch den folgenden Zusammenhang lässt sich die Gibbs'sche Enthalpie (ΔG) und der Entropieanteil (ΔS) als weitere Parameter indirekt nach Gl. 5 errechnen.

Gleichung 5: $\Delta G = -RT * \ln(K_A) = \Delta H - T\Delta S$

Die ermittelten Werte stellen apparente Werte (app) dar, da Effekte wie Verdünnungswärme und nicht-spezifische Effekte wie Pufferprotonierung einen Störeffekt verursachen können. Um den Einfluss von Störeffekte zu verringern, wurden alle Proben im identischen Puffer gelöst, und Proteine wurden in diesem Puffer mittels GPC umgepuffert (Abschnitt 2.4.4). Die ITC erfolgte mit der PEAQ-ITC (Malvern) und der dazugehörigen Auswertesoftware MicroCal PEAQ-ITC Control Software 1.1.0 (Malvern).

Tabelle 8: Standard-Bedingungen der ITC

Parameter	Einstellungen/Material
Temperatur	30 °C
Referenzenergie/Antwortrate	5 $\mu\text{cal/s}$ / hoch
Rührer	750 rpm
Referenzzelle	Wasser
Anlaufzeit	60 s
Injektionen	19 Stück, initial 1 x 0.4 μl , alle weiteren je 2.0 μl , 0.5 $\mu\text{l/s}$, im Abstand von 150 s
Messzelle	10 μM Protein in Puffer
Injektionsspritze	100 μM in Puffer

Bei der Single-Injektionskalorimetrie der *rproMTG* mit *rTAMP* erfolgte die einmalige Zugabe von 2 μl einer 100 nM *rTAMP*-Lösung zu 200 μl einer 550 μM *rproMTG*-Lösung. Im Messgerät wurde die Differenzleistung bis zum Erreichen des Ausgangswertes aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte anschließend nach Transturm *et al.* (2015) mit GraphPad Prism [113, 114].

Bei dieser Methode erfolgt die Messung der Wärmeentwicklungsrate bei der Spaltung des Substrates zum Produkt. Die gemessene Wärme (Q) wird als Funktion der Zeit (Δt) gemessen und ist als thermale Leistung definiert (Leistung = $\Delta Q / \Delta t$). Die Reaktionsgeschwindigkeit v korreliert dabei mit der gebildeten Wärme bzw. der molaren Menge an gebildetem Produkt je Zeiteinheit, wie Gl. 6 wiedergibt.

$$\text{Gleichung 6: } v = \Delta[P] / \Delta t = (\Delta Q / \Delta t) * (V * \Delta H_{\text{app}})^{-1}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit

V = Reaktionsvolumen

$[P]$ = molare Konzentration des generierten Produktes

ΔH_{app} = experimentell ermittelte molare Enthalpie der Reaktion

2.6.8. Diskontinuierlicher Aktivitätstest für TGasen: Hydroxamsäure-Assay

Der Hydroxamsäure-Assay ist ein etabliertes Verfahren für die Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität nach Grossowicz *et al.* [115]. Der Test basiert auf dem enzymatischen Einbau von Hydroxylamin in das synthetische Dipeptid Carbobenzoxy-L-glutaminyglycin durch Transglutaminase. Dabei entsteht ein zweizähniger Ligand, die Glutamylhydroxamsäure, die durch Bindung von Eisen-(III)-Ionen einen roten Farbkomplex bildet. Die Messung der Extinktion bei 525 nm ermöglicht die Quantifizierung des entstehenden Farbkomplexes.

Die Durchführung des Hydroxamsäure-Assays erfolgte in 1.5 ml Reaktionsgefäßen. Hierzu wurden 500 µl einer Substratlösung (10.2 mg/ml Dipeptid-Lösung in 0.1 M Hydroxylamin in Assaypuffer) im Reaktionsgefäß vorgelegt und für 10 min bei 37 °C temperiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl der zu analysierenden Probe gestartet und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 500 µl Stoppreagenz (eine 1 + 1 + 1 Mischung (v/v/v) aus 12% HCl, 5% FeCl₃ (w/v) in 0.1% HCl und 12% Trichloressigsäure (w/v)). Nach Zentrifugation bei 10,000 g für 5 min erfolgte die Messung der Extinktion bei 525 nm im BioSpectrometer (Eppendorf). Als Reagenzienblindwert wurde der Messung 50 µl Assaypuffer an Stelle der Probe zugesetzt. Die Berechnung der Volumenaktivität der MTG erfolgte nach Gl. 7.

$$\text{Gleichung 7: Volumenaktivität} = (\Delta E * V) / (\epsilon_{525} * d * v * t) = 4.47 * \Delta E [\mu\text{mol}/(\text{min} * \text{ml}) = \text{U/ml}]$$

ΔE = Differenz zwischen Analysenansatz und Reagenzienblindwert

V = Messvolumen (1.05 ml)

ϵ_{525} = 0.470 ml/(µmol*cm) molarer Extinktionskoeffizient des Fe(III)-Glutamylhydroxamat-Komplexes bei 525 nm

D = Küvettendurchmesser (1 cm)

V = Probenvolumen (0.05 ml)

t = Reaktionszeit (10 min)

Assaypuffer: 0.2 M Na Citrat pH 6.0

2.6.9. Kontinuierlicher Aktivitätstest für TGasen: Dimethylcasein-Assay

Das Prinzip des Dimethylcasein-Assays beruht auf den Transglutaminase-katalysierten Einbau von Monodansylcadaverin (MDC) in *N,N*-Dimethylcasein (DMC) und wurde erstmals durch Lorand *et al.* (1971) beschrieben [116]. Durch den Einbau verändert sich die Umgebung des MDC von hydrophil zu hydrophob. Dabei kommt es zu einem Anstieg der intrinsischen Fluoreszenzintensität des MDC bei 515 nm.

Zur Vorbereitung der Messung wurden 25 μ l 0.2 mM MDC-Stammlösung (20 μ M im Assay) und 40 μ l einer 0.1 mM DMC-Stammlösung (20 μ M im Assay) in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Nach Zugabe von 95 μ l Assaypuffer und 20 μ l der zu messenden Inhibitor-Stammlösung erfolgte eine Inkubation der Platte für 10 min bei 37 °C. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 20 μ l einer 0.25 μ M MTG-Stammlösung (Endkonzentration von 25 nM) gestartet. Die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 332 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm im POLARstar OPTIMA (BMG Labtech).

Assaypuffer: 50 mM Tris HCl pH 8.0, 200 mM NaCl

2.6.10. Diskontinuierlicher Aktivitätstest für Cysteinproteasen: para-Nitroanilid-Assay

Für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von SPI_{ac}-Proben gegenüber der Cysteinprotease Papain (EC 3.4.22.2) während der Reinigung wurde der diskontinuierliche para-Nitroanilid-Test im Mikrotiterplatten-Format durchgeführt. Der Test beruht auf der Spaltung eines synthetischen pNA-Substratpeptides (Z-Phe-Arg-pNA) durch proteolytische Aktivität der Protease. Die Proteolyse führt zur Freisetzung von para-Nitroanilin, welches eine Extinktionszunahme bei 405 nm zur Folge hat. Die Messung erfolgte im GENios Spectra Fluor plus (TECAN).

Für die Beurteilung von SPI_{ac}-Reinigungsproben wurden 50 μ l Assaypuffer, 10 μ l der zu analysierenden Probe und 20 μ l Substratstammlösung (2 mM Z-FR-pNA in EtOH) in der Kavität einer 96-Well-Platte vorgelegt und 10 min bei 37 °C und 750 rpm inkubiert. Der Start der Proteolyse erfolgte durch Zugabe von 20 μ l einer 5 mg/ml Papain-Stammlösung (*crude powder*) in Assaypuffer. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C und 750 rpm erfolgte der Abbruch der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Stoppreagenz (2 mM Iodacetamid-Lösung in Assaypuffer mit 20% DMSO). Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 405 nm. Bei jeder Messreihe wurde eine Positivkontrolle gemessen, bei der die Probe durch Assaypuffer ersetzt wurde. Mit Hilfe dieser Probe wurde die relative Papainaktivität berechnet und für die Beurteilung der jeweiligen Proben herangezogen.

Assaypuffer: 0.1 M Na Citrat pH 6.5

2.6.11. Kontinuierlicher Aktivitätstest für Cysteinproteasen: Aminomethylcoumarin-Assay

Die Bestimmung von IC_{50} -Werten und kinetischer Parameter von SPI_{ac} -Proben erfolgte mit spezifischen fluorogenen Substratpeptiden. Als Reportergruppe diente 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC), das eine kontinuierliche Messung ermöglicht. Die spezifische Spaltung der Substratpeptide führt zu einer Freisetzung von AMC und somit zu einem Anstieg der Fluoreszenz bei 450 nm nach Anregung bei 350 nm. Die Messungen erfolgten mit dem PHERAstar Plus (BMG LABTECH) im 96-Well-Format.

Für die IC_{50} -Messung wurde 70 μ l Assaypuffer in der Kavität einer 96 Well-Platte vorgelegt, und 10 μ l einer 15 nM Protease-Stammlösung (1.5 nM Endkonzentration) wurden zugegeben. Anschließend wurde die Platte bei 30 °C und 500 rpm für 15 min inkubiert. Der Start der Proteolyse erfolgte durch Zugabe von 20 μ l Substrat-Stammlösung. Nach 5 s orbitalen Schütteln im Fluoreszenzmessgerät erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität im Abstand von 30 s über 60 min. Entsprechende Inhibitorlösungen wurden durch Volumenreduktion des Assaypuffers und Zugabe an Inhibitor-Stammlösung zugesetzt. Die Auswertung erfolgte für Papain im Bereich von 5 – 15 min und für Chymotrypsin im Bereich von 1 – 5 min.

Für die Bestimmung der kinetischen Inhibitorparameter gegenüber Papain erfolgte eine Vorinkubation des Substrates von 10 min mit unterschiedlichen Mengen an Inhibitor bei 30 °C und 500 rpm. Die Proteolyse wurde im Anschluss durch Zugabe der jeweiligen Protease-Stammlösung gestartet. Die Assaybedingungen für die jeweilige Protease sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Assaybedingungen des Aminomethylcoumarin-Tests

Reagenzien	Papain	Chymotrypsin
Assaypuffer	50 mM Na Phosphat pH 6.8, 10 mM EDTA, 2 mM DTT	100 mM TrisHCl pH 7.8, 10 mM $CaCl_2$
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC (Bachem)	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (Bachem)
Substratkonz. im Assay	50 μ M	15 μ M

Die Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter erfolgte durch Inkubation von 1.5 nM Protease mit verschiedenen AMC-Substratkonzentrationen bei 30 °C über einen definierten Zeitraum. Die Umrechnung der Enzymaktivität in μ M/s erfolgte durch eine externe Kalibrierung mit freiem AMC. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe in Assaypuffer angefertigt und die erhaltene Fluoreszenzeinheit pro μ M AMC berechnet. Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter wurden die erhaltenen Messwerte mit Gl. 8 durch GraphPad PRISM 6.0 (Graphpad Software) ausgewertet.

Gleichung 8: $Y = v_{\max} * [S] / (K_M + [S])$

Y = Enzymaktivität (μM^{-1})

v_{\max} = maximale Enzymgeschwindigkeit (s^{-1})

[S] = Substratkonzentration (μM)

K_M = Michaeliskonstante (μM)

2.6.12. Aktivitätstest für P1'- Endoproteasen: *Dabcyl-Edans-Assay*

Der Nachweis der proteolytischen Aktivität Thermolysin-ähnlicher Metalloproteasen mit P1'-Spezifität erfolgte nach einem von Weimer *et al.* (2006) entwickelten Fluoreszenz-Assay [117]. Als Substrat diente *Dabcyl-Ser-Phe-EDANS* (Zedira GmbH, #D005). Die Metalloprotease bewirkt die Spaltung der Peptidbindung zwischen Serin und Phenylalanin. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen dem Löscharbstoff Dimethylaminoazobenzolcarboxyl (*Dabcyl*) zu fluoreszierender Ethylendiaminonaphthalinsulfonsäure (*EDANS*) verringert, und die intrinsische Fluoreszenz von *EDANS* wird messbar. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm im POLARstar OPTIMA (BMG Labtech).

Für die Aktivitätsmessung wurden 95 μl Assaypuffer in eine 96-Well-Platte vorgelegt und auf 30 °C temperiert. Anschließend wurde die jeweilige Proteaseverdünnung in Assaypuffer (5 nM im Assay) in einem Volumen von 95 μl zugegeben, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl 40 μM Substratstammlösung (2 μM Konzentration im Assay) gestartet. Die Durchmischung der Substanzen erfolgte im Messgerät durch orbitales Schütteln für 2 s bei 600 rpm mit anschließender Messung der Fluoreszenzintensität. Bei IC_{50} -Messungen erfolgte die Zugabe des Inhibitors als Stammlösung mit entsprechender Reduktion des Volumens an Assaypuffer. Mit Hilfe einer Positivkontrolle wurde die relative Proteaseaktivität berechnet und für die Beurteilung der jeweiligen Proben herangezogen.

Assaypuffer: 0.1 M Tris Acetat pH 6.0, 2 mM CaCl_2

2.6.13. Allgemeiner Proteaseaktivitätstest: Modifizierter Anson-Assay

Diese Methode beruht auf der partiellen Hydrolyse von Casein durch Proteasen und die damit verbundene Freisetzung von tyrosinhaltigen Peptiden. In dieser Arbeit wurde sie zur Charakterisierung der Hitzestabilität Thermolysin-ähnlicher Metalloproteasen eingesetzt. Hierzu wurden 200 μl einer 1%igen Caseinlösung in Assaypuffer mit 190 μl Assaypuffer versetzt und ca. 10 min auf die entsprechende Temperatur temperiert. Durch Zugabe von 10 μl der jeweiligen Proteasestammlösung wurde die Proteolyse gestartet (Tabelle 10). Der gesamte Ansatz wurde 10 min inkubiert und durch Zugabe von 600 μl 10% (w/v) Trichloressigsäure in Wasser abgestoppt. Nicht abgebautes Casein wurde dabei gefällt und durch Zentrifugation bei 10,000 g für 5 min abgetrennt. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion des Überstandes bei 280 nm. Der modifizierte Anson-Test wurde in dieser Arbeit für die Ermittlung des Temperaturoptimums von Proteasen eingesetzt. Die höchste Aktivität jeder Proteasemessreihe stellte die Positivkontrolle dar, auf die die anderen Werte einer Messreihe bezogen wurden. Dadurch konnte die relative Proteaseaktivität berechnet und das Temperaturoptimum ermittelt werden.

Tabelle 10: Proteaselösungen für den Anson-Test

Protease	Arbeitslösung	Endkonzentration im Assay
rTAMP	5 μM in Assaypuffer	125 nM
Thermolysin	3 μM in Assaypuffer	75 nM
Dispase	5 μM in Assaypuffer	125 nM

Assaypuffer: 0.1 M Tris Acetat pH 6.0, 2 mM CaCl_2

2.6.14. MTG katalysierte Biotinylierung

Für die Identifikation MTG-zugänglicher Glutamine auf Oberflächen von Substratproteinen wurde die Kopplung von Monobiotinylcadaverin (MBC) katalysiert durch MTG verwendet. Bei diesem Verfahren wird MBC durch seine Alkylkette mit endständiger Aminfunktion von der MTG als Acylakzeptor erkannt und mit zugänglichen Glutaminen auf der Oberfläche von Proteinen über eine Amidbindung kovalent verknüpft. Im Reaktionsansatz wurden 0.3 μM MTG mit 15 μM Zielprotein und 200 μM MBC bei 37 °C und 750 rpm in Markierungspuffer inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 95 °C heißem 5-fach SDS-Auftragspuffer (Abschnitt 2.6.2) und Inkubation für 10 min bei 95 °C abgebrochen. Die Proben wurden anschließend auf eine 15%ige SDS-PAGE gegeben und bei 200 V für 35 min getrennt (Abschnitt 2.6.2). Anschließend erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran wie in Abschnitt 2.6.15 beschrieben. Durch Inkubation der proteinbeschichteten Membran mit dem Streptavidin-

Farbstoffkonjugat IRDye 800CW (LI-COR), welches hochaffin die Biotinreste markierter Glutamine bindet, wurde die Markierung qualitativ und quantitativ mittels Fluoreszenzmessung bei 800 nm am Odyssey SA (LI-COR) erfasst und mit der ODYSSEY *Application* Software (Version 1.1.7., Licor) ausgewertet. Die Inkubation mit dem Streptavidin-Farbstoffkonjugat erfolgte nach folgendem Schema:

Dreimaliges Waschen der Membran mit 15 ml PBST für je 5 min bei RT
Inkubation des Blots in Odyssey <i>Blocking</i> Puffer PBS (LI-COR, # 927-40000) für 1 h bei RT
Dreimaliges Waschen der Membran mit 15 ml PBST für je 5 min bei RT
Inkubation des Blots mit dem Streptavidin-Farbstoffkonjugat IRDye 800CW (LI-COR, #926-32230) in PBST
Dreimaliges Waschen der Membran mit 15 ml PBST für je 5 min bei RT
zweimaliges Waschen der Membran mit 15 ml PBS für je 5 min bei RT
Messung der Fluoreszenzintensität

Markierungspuffer: 50 mM Tris HCl pH 8.0 mit 100 mM NaCl

PBS: 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl

PBST: 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (v/v)

2.6.15. Protein-Blotting

Beim Protein-*Blotting* erfolgt die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, die anschließend mit Hilfe unterschiedlicher Nachweisreaktionen detektiert werden können [118]. Für die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran erfolgte zuvor deren Auftrennung mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.6.2). Als Vorbereitung für den Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran wurden zwei Filterpapiere und das betreffende Gel in Transferpuffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde für ca. 10 s in Methanol und anschließend für 2 min in Transferpuffer geschwenkt. Im Anschluss erfolgte der luftblasenfeie Zusammenbau „*semi-dry*“ auf der Anode der TransBlot-Turbo™ *Blotting*-Apparatur (Biorad) wie in Abbildung 11 gezeigt. Der Proteintransfer erfolgte senkrecht zum Gel entlang eines elektrischen Feldes hin zur Anode durch Anlegen einer Spannung von 20 V für 60 min. Das Prinzip des Transfers basiert wie bei der SDS-PAGE auf der negativen Ladung SDS-beladener Proteine. Im Anschluss erfolgte die immunchemische Färbung (Abschnitt 2.6.16) der Proteine oder die Detektion biotinylierter Proteine mit einem Streptavidin-Farbstoffkonjugat (Abs. 2.6.14).

Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20% (v/v) MeOH

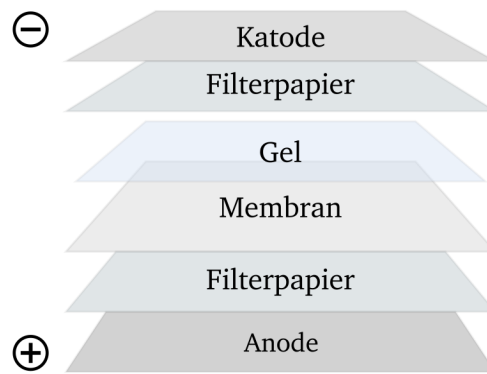


Abbildung 11: Aufbau eines Protein-Blots

2.6.16. Immunochemische Färbung von Proteinblots

Für die Identifikation von Proteinbanden auf einer Membran eignen sich spezifische Primärantikörper gegen das Zielprotein. Dabei nutzt man die Affinität der Bindung zwischen Antigen und Antikörper aus. Die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran wurde mit Hilfe blockierender Proteine und verschiedener Waschschriffe verhindert. Die Detektion der gebundenen Primärantikörper erfolgte anschließend mit einem Immunkonjugat aus Zweitantikörper und Enzym oder Farbstoff. Dabei bindet der sekundäre Antikörper mit der Reportergruppe an die Fc-Region des Primärantikörpers. In dieser Arbeit wurden ein Antikörperfarbstoffkonjugat IRDye 800CW der Firma LICOR verwendet. Die Markierung wurde qualitativ mittels Fluoreszenzmessung bei 800 nm am Odyssey SA (LI-COR) erfasst und mit der ODYSSEY *Application* Software (Version 1.1.7., LI-COR) ausgewertet. Für die Abschätzung der Proteingröße wurde ein PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) eingesetzt. An dessen Proteinstandards ebenfalls IR-Farbstoffe konjugiert waren, um die Visualisierung am Odyssey SA (LI-COR) zu ermöglichen. Die immunochemische Färbung von PVDF-Proteinblots erfolgte nach folgendem Schema:

Dreimaliges Waschen der Membran mit 15 ml PBST für je 5 min bei RT
Inkubation der Membran in Odyssey <i>Blocking</i> Puffer PBS (Licor, # 927-40000) für 1 h bei RT
Dreimaliges Waschen der Membran mit 15 ml PBST für je 5 min bei RT
Inkubation der Membran mit Anti-His-pAB (produziert in <i>Rabbit</i>) (Roth, #3742) für 1 h bei RT
Dreimaliges Waschen der Membran mit 15 ml PBST für je 5 min bei RT
Inkubation der Membran mit <i>Goat anti-Rabbit</i> IRDye 800CW (LI-COR, #926-32211) in PBST
Dreimaliges Waschen der Membran mit 15 ml PBST für je 5 min bei RT
Zweimaliges Waschen der Membran mit 15 ml PBS für je 5 min bei RT
Messung der Fluoreszenzintensität

PBS:	1.8 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl
PBST:	1.8 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (v/v)

2.6.17. Proteinkristallisation

Die 3D-Strukturaufklärung von Proteinen erfolgte am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig durch Dr. Scrima und Dr. Schmelz sowie am Institut für pharmazeutische Chemie der Goethe Universität Frankfurt durch Dr. Krämer der AG Knapp. Für die Kristallisation der Proteine wurden gereinigte Proteinlösungen mit einer Reinheit > 95% in entsprechender Menge zur Verfügung gestellt.

2.6.18. HPLC Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie

Die HPLC Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) diente der massenspektroskopischen Analyse von Proteinen, Peptiden und niedermolekularer Substanzen. Der massenspektroskopischen Untersuchung wurde eine chromatographische Trennung vorgeschaltet. Die Detektion eluierender Substanzen erfolgte standardisiert bei 220 bzw. 280 nm. Es kamen unterschiedliche Systeme für die analytische HPLC ESI-MS zur Anwendung wie in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Aufbau der analytischen HPLC ESI-MS

Probe	Anlage	Säule	Elutenten
Peptide: IP1, IP2, IP3	Shimadzu LCMS-2020	Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP column (250 × 4.60 mm, 4 µm, 80 Å)	A: Wasser mit 0.1% Ameisensäure
			B: Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure
SPI _{ac} : AC1, AC2	Agilent Series-1200 6110 Quadrupole LC/MS	Waters Sunfire C18 (100 x 2.1 mm, 3.5 µm, 100 Å)	A: Wasser mit 0.1% Ameisensäure
		Macherey-Nagel EC 250/4 Nucleodur 300-5 C4ec	B: Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure
		Macherey-Nagel EC 250/4 Nucleodur 300-5 C18ec	

2.6.19. MALDI TOF/N-terminale Sequenzierung

Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz sowie der molaren Masse wurde am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig durch Dr. Scrima und Dr. Schmelz veranlasst. Für die Analytik wurden mittels SDS-PAGE gereinigte Proteinproben in entsprechender Menge zur Verfügung gestellt.

2.6.20. MS-MS-Analytik inhibitorischer Peptide

Für die strukturelle Aufklärung der inhibitorischen Peptide (SPI-AC1 und SPI-AC2) aus dem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* erfolgte durch die Firma Proteome Factory in Berlin eine massenspektroskopische Untersuchung. Für die Analytik wurden nach dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren Peptide isoliert und gereinigt in entsprechender Menge zur Verfügung gestellt.

2.6.21. NMR-Analytik inhibitorischer Peptide

Für die strukturelle Aufklärung der inhibitorischen Peptide (SPI-AC1 und SPI-AC2) erfolgte eine Analytik der Substanzen durch NMR-Spektroskopie an der Technischen Universität Darmstadt mit Interpretation durch Prof. Meusinger. Für die Analytik wurden nach dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren Peptide isoliert und gereinigt in entsprechender Menge zur Verfügung gestellt.

2.7. Festphasenpeptidsynthese der Inhibitorpeptide IP1, IP2 und IP3

Die Festphasensynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) ist eine Methode für die chemischen Herstellung von Peptiden an einem polymeren Trägermaterial [119]. Die Synthese erfolgt vom C- zum N-Terminus, daher liegen die einzuführenden Aminosäuren N-seitig geschützt (Fmoc/Boc-Schutzgruppe) vor. Vor jedem Kopplungsschritt erfolgt die Aktivierung der Carboxylgruppe der zuletzt gekoppelten Aminosäure durch Abspaltung der Schutzgruppe.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die automatisierte Synthese an dem *Liberty CEM Microwave Peptide Synthesizer* (Kamp-Lintfort). Als Trägerharz diente AmphiSpheres 40 RAM (Agilent Technologies, #PL3867). Die Kopplung der Aminosäuren im 0.25 mmol Maßstab erfolgte basierend auf einem N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC)/Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat(Oxyma)-Aktivierungssystem. Die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20% Piperidin in N,N-Dimethylformamid (DMF) mit 0.1 M Oxyma durchgeführt. Die verwendeten Aminosäuren (Iris-Biotech) waren entsprechend der Standard-Fmoc/tert-Bu-Strategie geschützt. Ausnahme war ein Serinrest, der eine orthogonal spaltbare Triphenylmethyl-Schutzgruppe an seiner β -Hydroxygruppe besaß. Im Anschluss an die automatisierte Fmoc-SSPS wurde die freie α -Aminogruppe durch eine tert-Butyloxycarbonyl(Boc)-Gruppe geschützt. Dies erfolgte durch Inkubation des Peptidharzes mit 8 eq Di-tert-butylcarbonat und 16 eq Diisopropylethylamin (DIEA) in DMF für 1 h bei RT.

Die orthogonale Trt-Schutzgruppe der Serinseitenkette wurde durch Inkubation mit CH_2Cl_2 /Trifluoressigsäure (TFA)/Triethylsilan (TES) (94/1/5, v/v/v) für zweimal 2 min, und anschließend 5 min, unterbrochen durch gründliches Spülen mit CH_2Cl_2 (sechsmal 10 ml), entfernt. Eine Chloracetatgruppe wurde in die im Serin zugängliche Hydroxygruppe durch Inkubation mit 4 eq Chloressigsäureanhydrid und 8 eq DIEA in wasserfreiem CH_2Cl_2 für 2 h bei RT eingeführt.

Anschließend wurde das Peptidharz mit CH_2Cl_2 (6 mal 10 ml) und Diethylether (2 mal 5 ml) gewaschen. Die *N*-terminale und die Seitenkettenentschützung sowie das Abspalten vom Harz erfolgte durch Inkubation des getrockneten Peptides mit einem Standardspaltungsreagenz (TFA/TES/ H_2O , 48/1/1, v/v/v). Nach 3 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Peptide gefällt und mit kaltem Diethylether gewaschen (3 mal 40 ml). Im Anschluss erfolgte die Isolierung der Peptide durch eine semi-präparative RP-HPLC (Abschnitt 2.5.5) und die Analyse durch LC-ESI MS (Abschnitt 2.6.18) nach Lyophilisation (Abschnitt 2.5.7).

3. Ergebnisse

3.1. Gentechnische Arbeiten

Die Protein-codierende DNA-Sequenz eines Ausgangsplasmids wurde mittels PCR amplifiziert und in das Expressionsplasmid pET22b(+) eingebracht. Das pET-System ist das derzeit leistungsstärkste System für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*. Die Gene in pET-Plasmiden stehen unter Kontrolle starker Bakteriophagen-T7-Transkriptions- und Translationssignale, sodass ihre Expression erst nach Induktion der T7-RNA-Polymerase in den Zellen erfolgt. Das T7-Promotor-getriebene System wurde ursprünglich von Studier und Kollegen entwickelt [120-123]. Die verwendeten Gene wurden vor der Herstellung durch die Firma GenScript für die Produktion in *E. coli* codonoptimiert. Nach Amplifikation des entsprechenden Gens erfolgte die Restriktion des Amplifikats sowie des Zielvektors mit identischen Restriktionsenzymen. Anschließend wurde das *Insert* in den Vektor über Ligation eingebracht. Nach Transformation chemisch kompetenter *E. coli* XL1-Blue mit dem generierten Expressionsvektor erfolgten die Vervielfältigung der DNA und die Sequenzanalyse mittels DNA-Sequenzierung. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 12 für das optimierte SPI_{opt}-Gen exemplarisch gezeigt.

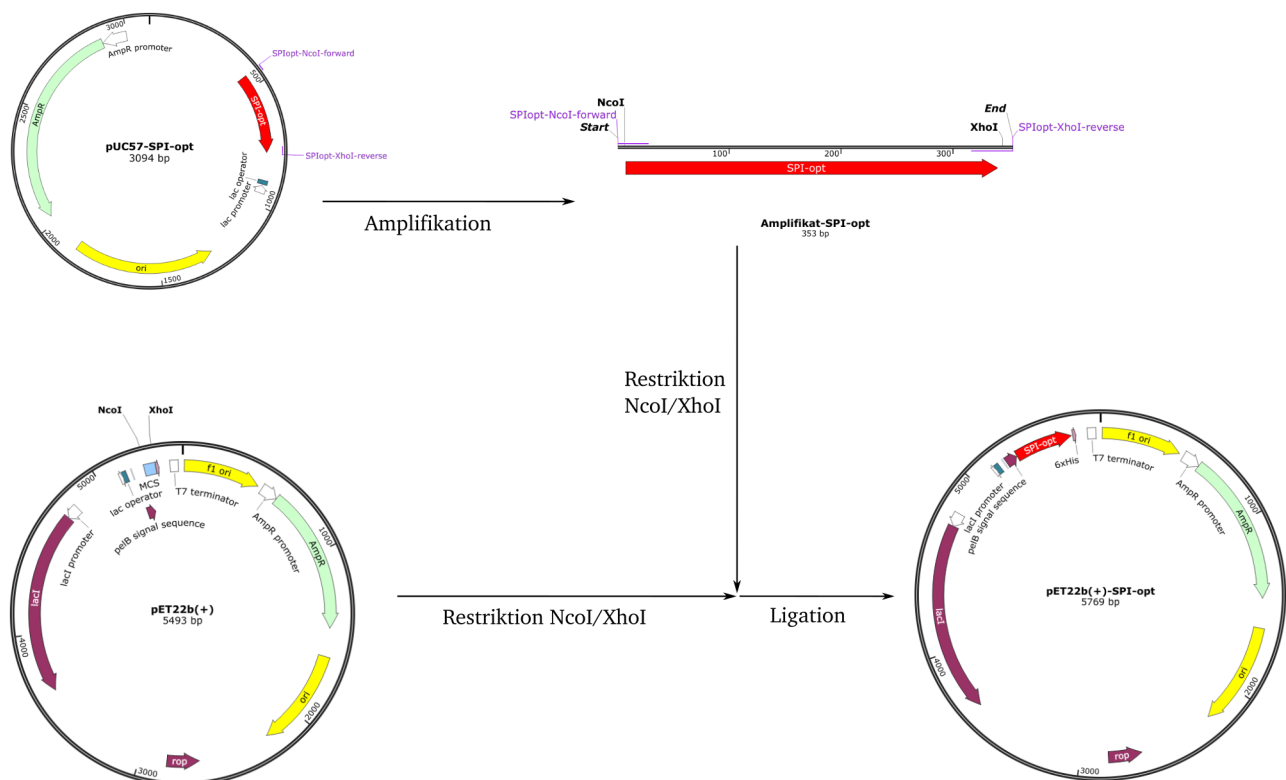


Abbildung 12: Klonierungsstrategie für das SPI_{opt}-Gen in pET22b(+).

Im ersten Schritt erfolgte die Amplifikation des SPI_{opt}-Gens des pUC57-SPI-opt-Plasmids mittels PCR. Das Amplifikat sowie der Zielvektor pET22b(+) wurden mit identischen Restriktionsenzymen (NcoI/XhoI) geschnitten und mit T4-DNA-Ligase ligiert. Der so erhaltene Vektor wurde für die Proteinexpression in *E. coli* eingesetzt.

Analog zur SPI_{opt}-Klonierung erfolgte die Klonierung des SSTI_{opt}-Gens mit MscI/XhoI in pET22b(+). Die Klonierung über die Restriktionsendonukleasen NcoI/XhoI bzw. MscI/XhoI ermöglichte das Einbringen des gewünschten Gens zwischen der pelB-Leader-Sequenz für die Translokation des Proteins in das Periplasma von *E. coli* und der Sequenz für einen Affinitätstag (6xHis-Tag) in der multiplen Klonierungsstelle des pET22b(+). Da die rekombinante Produktion von SPI und SSTI für die strukturelle und funktionale Charakterisierung erfolgte, wurde die Reinigung über einen Affinitätstag vermieden, um einen Einfluss des 6xHis-Tags auf die Proteineigenschaften auszuschließen. Daher wurde über die verwendeten *reverse-Primer* vor der Plasmid-DNA für den 6xHis-Tag ein Stopp-Codon eingeführt, um jede Störung der Proteinkonformation durch ein zusätzliches Peptid zu vermeiden.

Als Grundlage für die Klonierung des TAMP-Expressionsvektors diente ein proTAMP_{opt}-Gen, welches nur den Bereich des Vorläuferproteins (Gly34-Phe760) abdeckte. Da das native Signalpeptid oft eine wichtige Funktion während der Faltung von Thermolysin-ähnlichen neutralen Metalloproteasen einnimmt [124-127], wurde über mehrere Amplifikationen die für *E. coli* optimierte Sequenz des Signalpeptids aus *S. mobaraensis* eingeführt. Dabei wurde mit drei aufeinander aufbauenden *forward-Primern* und identischen *revers-Primern* die DNA-Sequenz des Signalpeptides in drei Amplifikationsschritten aufgebaut. Anschließend erfolgte ähnlich zur SPI_{opt}-Klonierung die Einbringung des Gens in einen pET22b(+)-Vektor. Die TAMP_{opt}-Klonierung erfolgte jedoch über die Restriktionsschnittstellen NdeI/XhoI ohne Einführung eines Stopp-Codons am 3'-Ende des Gens. Durch die Verwendung von NdeI/XhoI entfiel die DNA für die pelB-Leader-Sequenz bei der Klonierung. Die generierten pET22b(+) Plasmide für TAMP und SSTI sind in Abbildung 13 dargestellt.

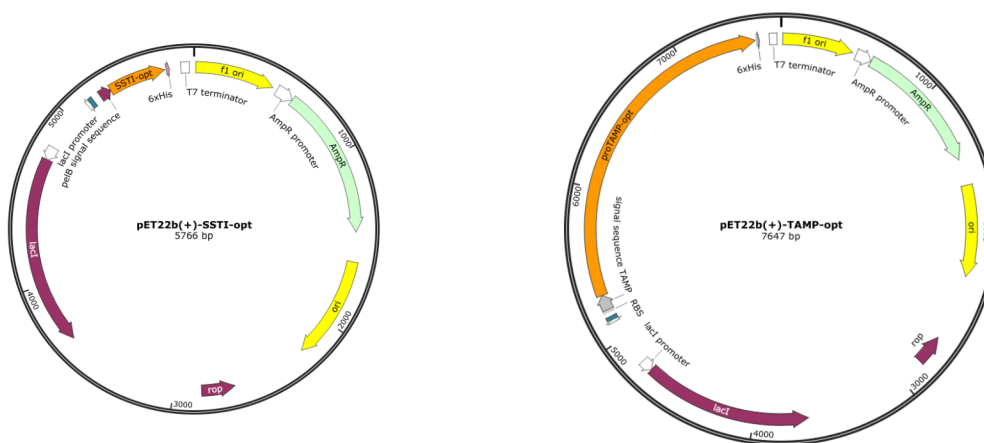


Abbildung 13: Expressionsvektoren für die rek. Produktion von SSTI und TAMP in *E. coli*.

Für die Untersuchung von Proteineigenschaften wurden gezielt Punktmutationen mittels *size overlap extension* (SOE) PCR in das SPI- und das SSTI-Gen eingebracht. Als Grundlage für diese Klonierung dienten die pET22b(+)-Konstrukte.

3.2. Rekombinante Transglutaminase aktivierende Metalloprotease (rTAMP)

Wie einleitend beschrieben nimmt die Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease (TAMP) durch die Aktivierung von proMTG zum reifen Enzym eine zentrale Rolle im Lebenszyklus von *S. mobaraensis* ein. Um die Interaktion zwischen TAMP und proMTG sowie die Regulierung ihrer Aktivität durch das intrinsische Inhibitorprotein SSTI zu charakterisieren, wurden Proteinmengen benötigt, die sich durch Extraktion aus Oberflächenkulturen nicht bereitstellen lassen. Aus diesem Grund erfolgte die Etablierung der rekombinanten Produktion der TAMP in *E. coli*.

3.2.1. Reinigung von rTAMP

Für die rekombinante Produktion von TAMP wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit dem Plasmid pET22b(+)-TAMP_{opt} transformiert. Die Proteinexpression erfolgte in 6 l Autoinduktionsmedium über 22 h bei 28 °C. Nach Zellernte und Ultraschallaufschluss begann die Reinigung der rTAMP aus zellfreien Zelllysaten bei 4 °C. Im Folgenden werden die Einzelschritte der chromatographischen Reinigung beschrieben. Zellfreies Zelllysate wurde mit 4 ml/min über eine 5 ml HisTrapTM-HP-Säule chromatographisch gereinigt (Abbildung 14).

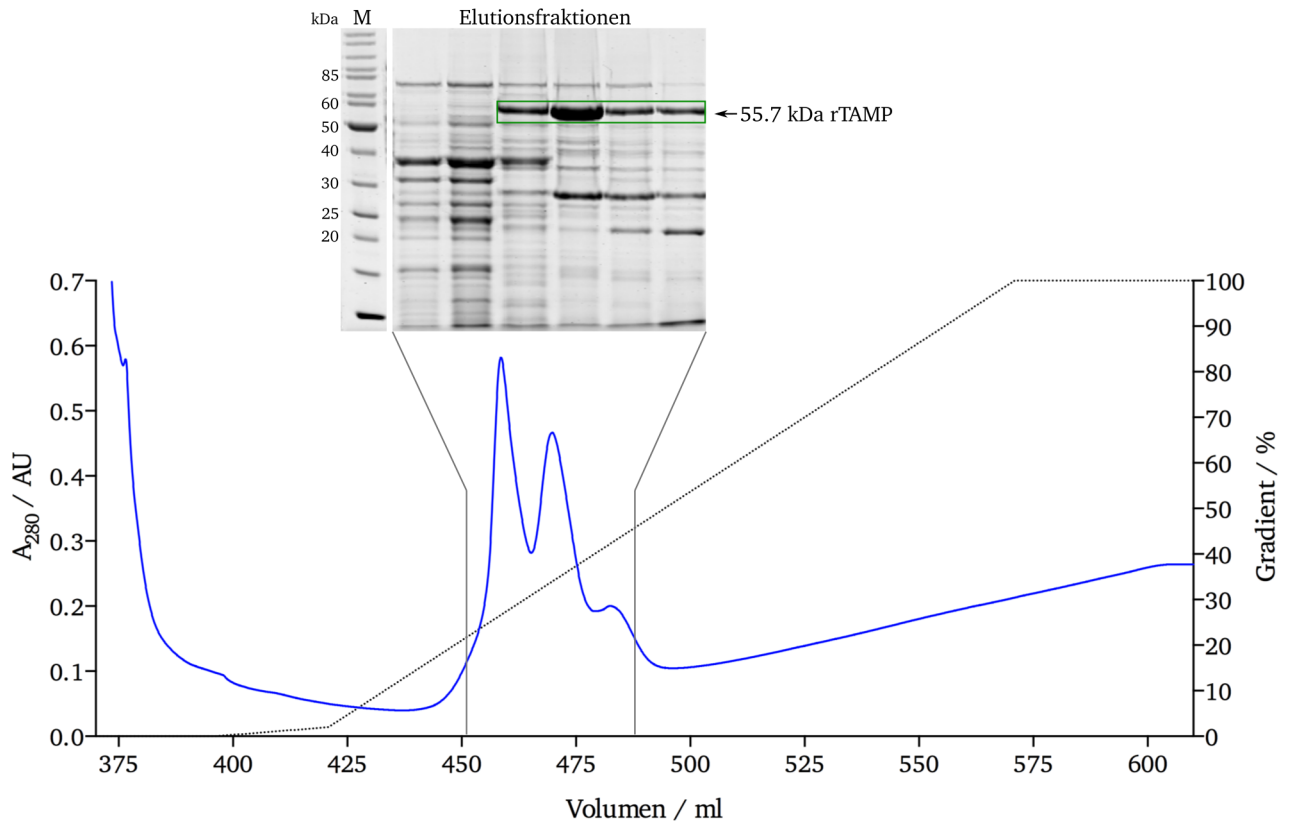


Abbildung 14: Chromatogramm und SDS-PAGE der Anreicherung von rTAMP durch IMAC.

Die Reinigung von Zelllysate (*E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+)-TAMP_{opt}) auf einer 5 ml HisTrap™-HP-Säule (GE Healthcare) erfolgte bei 4 °C und einer Flussrate von 4 ml/min mit einem linearen Imidazolgradienten von 0 – 500 mM in 50 mM Tris HCl pH 8.0, 300 mM NaCl. Das theoretische Gradienten-Mischungsverhältnis ist als gepunktete Linie dargestellt. Die Proteindetektion erfolgte bei 280 nm (blaue Linie) mit anschließender Analytik mittels 12.5%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Die Größenzuordnung erfolgte mit einem Molekulargewichtsmarker (M). Vereinigte Fraktionen sind durch einen grünen Kasten gekennzeichnet.

Die Analyse mit SDS-PAGE zeigte die erfolgreiche Bindung des Proteins (apparente molare Masse von 57 – 58 kDa) an die IMAC-Säule. Weiterführende Analytik mittels *N*-terminaler Sequenzierung und Maldi-TOF Analyse am HZI in Braunschweig (Abschnitt 2.6.19) ermöglichten die Identifikation dieser Bande als rTAMP mit einer molaren Masse von 55.7 kDa. Fraktionen die entsprechend rTAMP enthielten wurden vereinigt und über Nacht bei 4 °C gegen 50 mM Tris HCl pH 8.0 dialysiert, um Imidazol sowie überschüssige Salze zu entfernen.

Das Retentat der Dialyse nach IMAC wurde mit 1 ml/min über eine 1 ml HiTrap-CaptoQ-Säule (GE Healthcare) chromatographisch gereinigt (Abbildung 15).

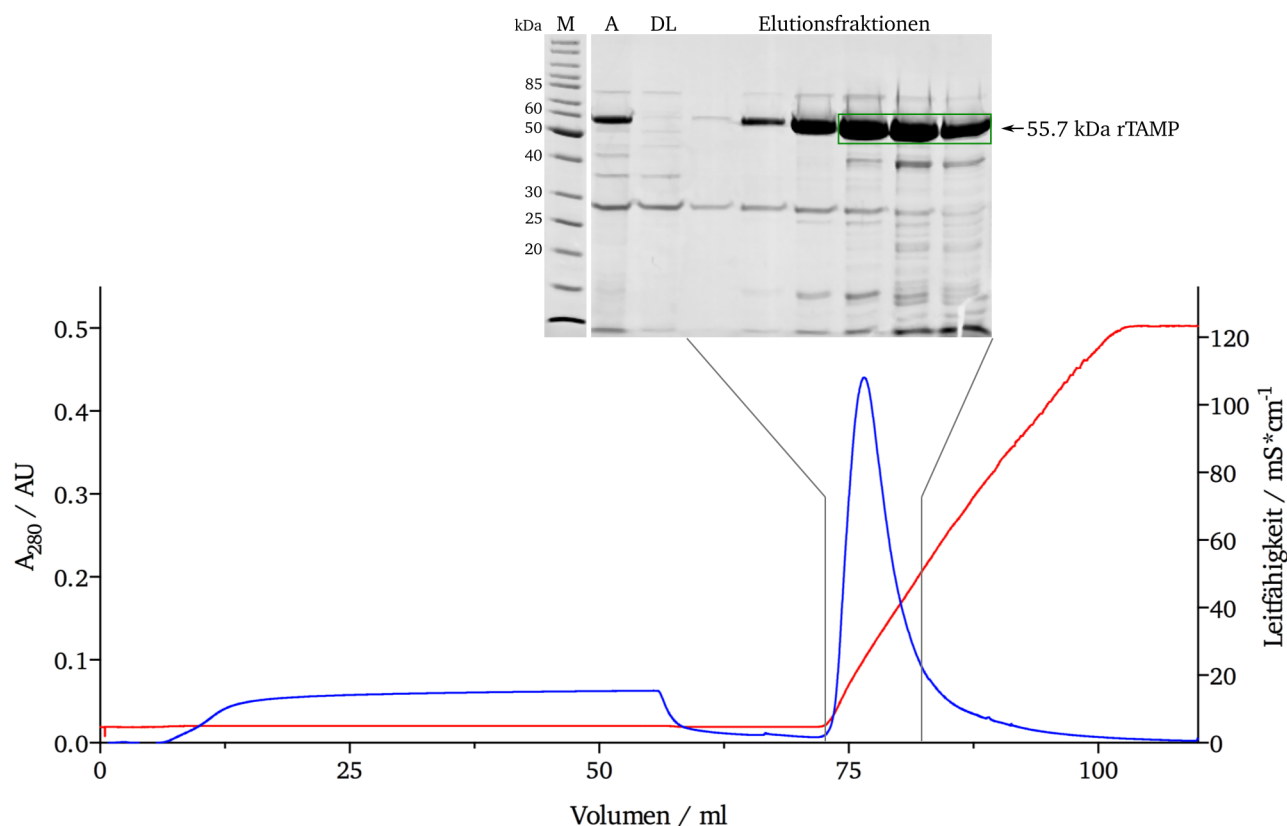


Abbildung 15: Chromatogramm und SDS-PAGE der IAC von rTAMP.

Die Reinigung des Retentates der Dialyse nach IMAC auf einer 1 ml HiTrap-CaptoQ-Säule (GE Healthcare) erfolgte bei 4 °C mit 1 ml/min und einem linearen Salzgradient von 0 – 1 M in 50 mM Tris HCl pH 8.0. Die Leitfähigkeit ist als rote Linie und die Proteinabsorption bei 280 nm als blaue Linie dargestellt. Im Anschluss an die IAC folgte die Analytik mittels 12.5%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Für die Größenordnung wurde ein Molekulargewichtsmarker (M) mitgeführt. Der Auftrag (A) und die nicht bindenden Proteine als Durchlauf (DL) sind gekennzeichnet. Vereinigte Fraktionen sind durch einen grünen Kasten markiert.

Über die IAC wurde im Wesentlichen das Protein mit einer apparenten molaren Masse von ca. 27 kDa abgetrennt, da diese Verunreinigung sich in der folgenden GPC nur sehr schlecht entfernen ließ. Die weiterführende Analytik mittels *N*-terminaler Sequenzierung und Maldi-TOF-Analyse am HZI in Braunschweig (Abschnitt 2.6.19) ermöglichte die Identifikation dieser Bande als *C*-terminales rTAMP-Fragment mit einer molaren Masse von 21.4 kDa. Fraktionen mit entsprechender Reinheit wurden vereinigt und mit Hilfe von Zentrifugationskonzentratoren für die anschließende GPC auf ca. 1 ml eingengt.

Das Konzentrat der IAC wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min über eine 120 ml Superdex 75 pg *HiLoad* 16/600-Säule (GE Healthcare) chromatographisch gereinigt. Die GPC diente vornehmlich der finalen Abtrennung des 21.4 kDa großen Fragmentes sowie der Umpufferung in den Lagerpuffer (Abbildung 16).

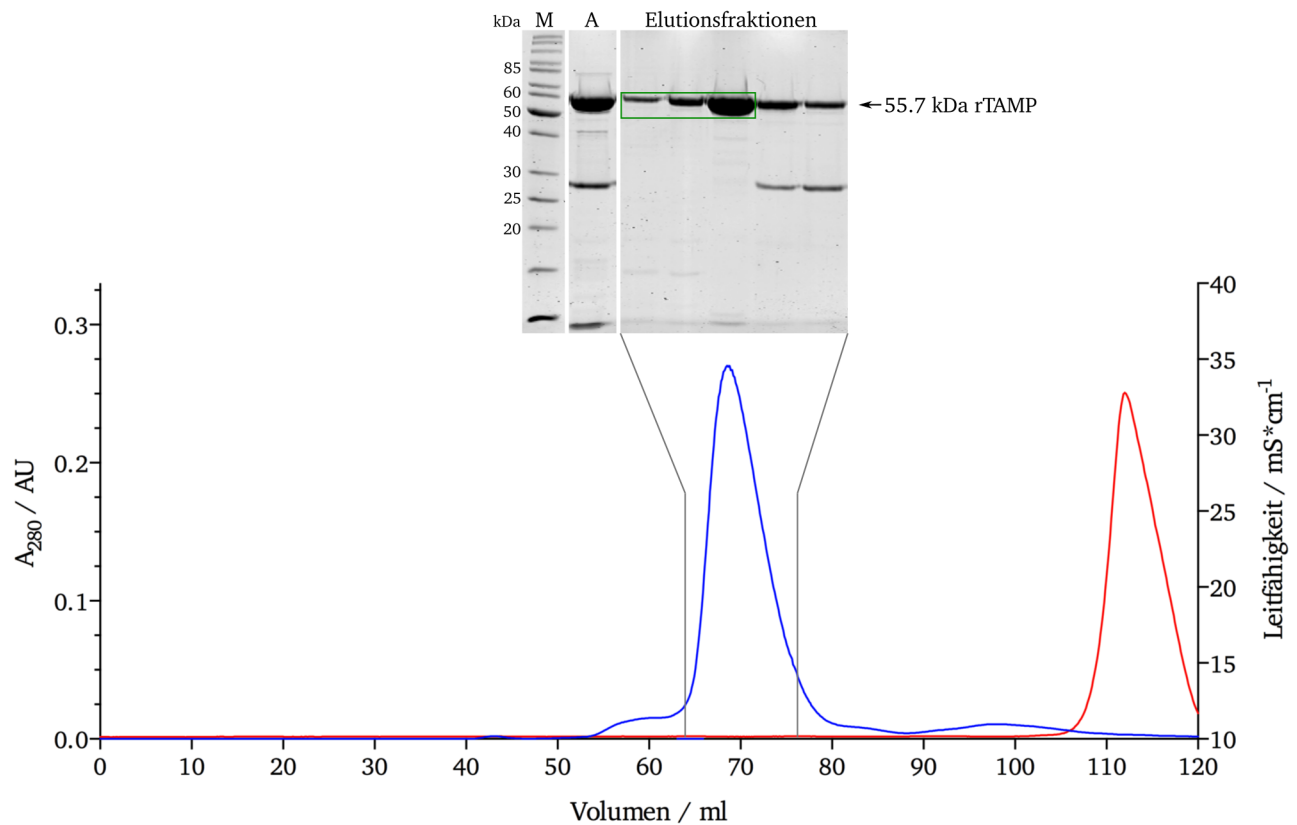


Abbildung 16: Chromatogramm und SDS-PAGE der GPC von *rTAMP*.

Die Reinigung des IAC-Konzentrats erfolgte auf einer 120 ml Superdex 75 pg *HiLoad* 16/600-Säule (GE Healthcare) bei 4 °C und einer Flussrate von 1 ml/min in 20 mM Hepes NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl. Die Leitfähigkeit ist als rote Linie und die Proteinabsorption bei 280 nm als blaue Linie dargestellt. Die Analytik erfolgte mit 12.5%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Für die Größenzuordnung wurde ein Molekulargewichtsmarker (M) mitgeführt. Der Auftrag (A) ist gekennzeichnet und vereinigte Fraktionen sind durch einen grünen Kasten markiert.

Die Analytik mittels SDS-PAGE zeigte den hohen Reinheitsgrad der *rTAMP*. Fraktionen mit einer Reinheit größer 95% wurden vereinigt, und die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt. Die Lagerung erfolgte nach Einfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80 °C. Die Proteinproben wurden für Charakterisierungsexperimente eingesetzt. Für die *rTAMP* aus *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+)-*TAMP_{opt}* ergaben sich Ausbeuten von 2 – 3 mg aus 6 l Anzuchtvolumen.

3.2.2. Primärsequenz der *rTAMP*

Vor dieser Arbeit gab es noch kein etabliertes Verfahren für die rekombinante Produktion von *rTAMP*. Daher erfolgte im ersten Schritt die Identifizierung der proteolytisch aktiven *rTAMP* nach Prozessierung im zellfreien Zelllysats von *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+)-*TAMP_{opt}*. Mittels Zymogramm konnte ein proteolytisch aktives Enzym mit einer apparenten Molmasse von ca. 57 – 58 kDa identifiziert werden. Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde ein Proteinblot angefertigt und immunochemisch mit Anti-His-Antikörpern Histidin-reiche Proteine detektiert. Vornehmlich erfolgte die Detektion der *rTAMP* aufgrund ihres rekombinant fusionierten 6xHis-Tags. Der Blot bestätigte die

Ergebnisse des Zymogramms und identifizierte ein signifikant auftretendes C-terminales Abbaufragment (apparente Molmasse von 27 kDa) der *rTAMP* (Abbildung 17). Es wurde deutlich, dass der 6xHis-Tag der *rTAMP* im Verlauf der Reinigung verloren geht und das Endprodukt kaum noch durch den polyklonalen Anti-His-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Die beobachtete C-terminale Verkürzung der *rTAMP* ist sehr wahrscheinlich auf die proteolytische Aktivität von *E.-coli*-Proteasen während der Reinigung zurückzuführen, da dieses Fragment nach abschließender Reinigung nicht mehr als Abbauprodukt auftrat.

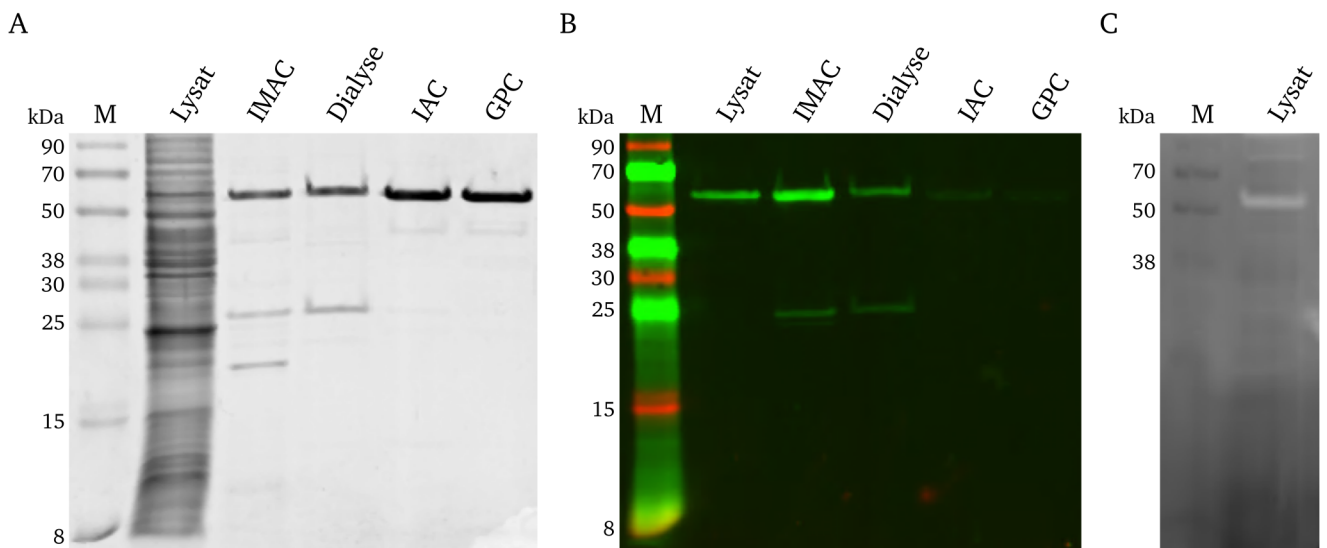


Abbildung 17: Identifizierung der katalytischen *rTAMP* durch SDS-PAGE.

Die Probenanalytik des Reinigungsergebnisses erfolgte nach jedem Reinigungsschritt. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde Chameleon Duo *prestained* verwendet. A) 12.5%ige SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt. B) Proteinblot mittels immunochemischer Färbung mit Anti-His-Antikörper und Goat anti-Rabbit IRDye 800CW visualisiert am Odyssey SA. C) Zymogramm mit *bovinem* Albumin, Coomassie-gefärbt.

Um die Zusammensetzung der durch SDS-PAGE identifizierten *rTAMP*-Proteine zu bestimmen, wurden die entsprechenden Proteine am HZI in Braunschweig analysiert. Die N-terminale Sequenzierung ergab für die apparente 57 - 58 kDa-*rTAMP* einen N-Terminus von GT[?]NSQ. Damit wurde die durch Zotzel *et al.* beschriebene Schnittstelle für das Propeptid und der Beginn der reifen Domänen bestätigt [72]. Zudem konnte mit Hilfe von MALDI-TOF eine Molmasse von 55.693 – 55.893 kDa ermittelt werden. In Kombination mit dem identifizierten N-Terminus musste entsprechend der C-Terminus mit ~FLE – ~FLEHH enden. Die Ergebnisse zeigen klar den Abbau des Propeptides durch *rTAMP* und die Selbstaktivierung, wie sie für *wTAMP* beschrieben ist (Abbildung 18).

MRPTQRRAVATGALVAVTAMLA VGVQTT SANAGQDKAAHPAPRQSIHKPDPGAEPVKLTSPQRAELIRDANATKAETAKNLGLGAKEKLVVKD VVKDKNGTLHTRYERTYDGLPVLGGDLVVDATRSGQVKTA AKATKQRIAVASTTPSLAASAAEKDAVKAARAKGSKAGKADKAPRKVVWAAKGTPVLAYETVVG VQDDGTPSQLHVITDAKTGKKLFEFQGVKQGTGNSQHSQGVQIGTTKSGSSYQMNDTTRGGHKTYNLNHGSSGTGTLFTDSDDVWGNGTNSDPATAGVDAHYGAQLTWDYYKNVHGRNGIRGDGVGAYSRVHYGNNYVNAFWDDSCFCMTYGDGNGIPLTSTIDVAAHEMTHGVT SATANLTYSGESGGLNEATSDMMATAVEFWANNPADPGDYLIGEKININGDGTPLRYMDKPSKDGASKDAWYSGLGGITDVHYSSGPANHWFYLA SEGSGPKDIGGVHYDSPTS DGLPVTGVGRDNAAKIWFKALTERMQSNTDYKGARDATLWAAGELFGVNSDTYN NVANAWAAINVGPRASSGVSVTSPGDQTSIVNQAVSLQIKATGSTSGALTYSATGLPAGLSINASTGLISGTPTTTGTSNVTVTVKDSAGKTGSTSEFKWTVNTTGGGSVFENTTQVAIPDAGAAVTSPIVVTRSGNGPSALKVDVNIHTHYRGDLTIDL VAPNGKTRWLKNSDAWDSAADVSEYTVVDASSVSANGTWKLVQDVYSGDSGTIDKWRLTFLEHHHHHH

Abbildung 18: Primärsequenz von *rTAMP* produziert in *E.coli*.

Das Signalpeptid ist orange, das Propeptid gelb, das reife Enzym grün und der gentechnisch eingeführte 6xHis-Tag mit LE-Spacer blau unterlegt. Die identifizierte Sequenz für den N-Terminus des reifen Enzyms ist mit einer durchgängigen, für das 21.4 kDa große Fragment einer gestrichelten Linie hervorgehoben. Die N-terminale Sequenzierung der Proteine erfolgte am HZI in Braunschweig.

Für das Fragment mit der apparenten Molmasse von 27 kDa ergab sich ein N-Terminus von VSVTSPGDQT und eine molare Masse von 21.443 kDa. Somit handelt es sich um ein C-terminales Abbaufragment der *rTAMP*, das im Zymogramm keine proteolytische Aktivität aufwies. Dieses Fragment beinhaltet eine C-terminal lokalisierte Domäne der *rTAMP*, welche strukturell mit der P-Domäne von Konvertasen verwandt ist. Für die *wTAMP* aus *S. mobaraensis* konnte diese Domäne nicht nachgewiesen werden [72]. Die Struktur der *rTAMP* weist darauf hin, dass die Abspaltung der Konvertase-Domäne der *wTAMP* entweder während der Kultivierung von *S. mobaraensis* durch andere Proteasen im Kulturmedium oder während der anschließenden Reinigungsprozedur erfolgte [72]. Des Weiteren unterstreicht der für die *rTAMP* experimentell ermittelte pI von 6.4, der um 1.4 pH-Einheiten vom isoelektrischen Punkt der *wTAMP* (pI von 5.0) abweicht, die strukturellen Unterschiede beider Proteasen.

3.2.3. Aktivität und Stabilität der *rTAMP*

Die rekombinante Variante der TAMP weist eine hohe strukturelle Stabilität auf. Jedoch kam es bei der Denaturierung von *rTAMP*-Proben für die SDS-PAGE in Gegenwart von 2 – 4 mM Ca^{2+} zur Autolyse und Fragmentierung. Um diesen Effekt zu unterdrücken, wurden *rTAMP*-Proben in Gegenwart von 10 mM EDTA denaturiert. Die Untersuchung des Temperatur- und pH-Optimums zeigten die nahe Verwandtschaft der *rTAMP* zu den neutralen Metalloproteasen. Das ermittelte pH-Optimum lag im Bereich von 5.8 – 6.5. Die *rTAMP* weist eine geringfügig höhere Hitzebeständigkeit als Dispase (Bacillolysin, Gentlyase) auf, erreicht jedoch nicht die Stabilität von Thermolysin. Im Vergleich zu Dispase besitzt *rTAMP* eine größere Stabilität jenseits des Temperaturoptimums und denaturiert erheblich langsamer. Bei 75 °C war noch 80% der Aktivität vorhanden (Abbildung 19). Thermolysin unterscheidet sich von Bacillolysin durch ein zusätzlich gebundenes Calciumion [128, 129]. Ähnlich wie Bacillolysin scheint *rTAMP* durch drei Calciumionen und zusätzlich durch zwei Cysteine und eine

P-Domäne stabilisiert zu sein. Die P-Domäne sowie die Cysteine fehlen sowohl Thermolysin als auch Bacillolysin.

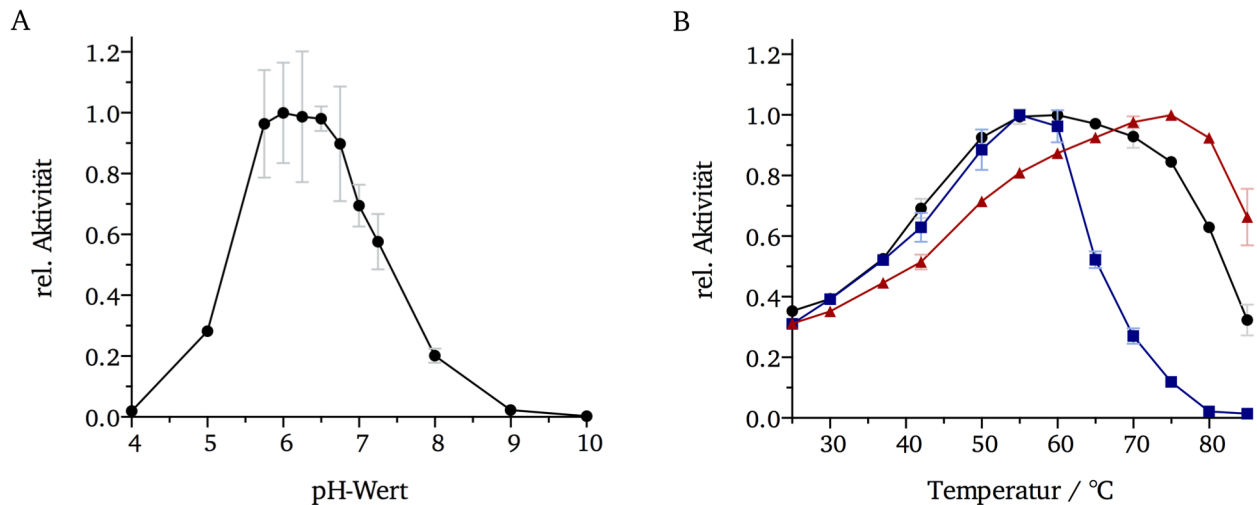


Abbildung 19: pH- und Temperaturoptimum von rTAMP.

A) Das pH-Optimum wurde mit 2 μ M *Dabcyl-SF-EDANS*, 5 nM rTAMP, 2 mM CaCl_2 und 5% DMSO in 100 mM Na Acetat (pH 4.0, 5.0), 100 mM Bis Tris (pH 5.8 – 7.3), 100 mM Tris HCl (pH 8.0, 9.0) und 100 mM Glycin (pH 10.0) bei 30 °C ermittelt. B) Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte für 125 nM rTAMP (schwarze Kreise), 125 nM Bacillolysin (blaue Quadrate) und 75 nM Thermolysin (rote Dreiecke) mit 0.5% Casein in 100 mM Tris Acetat pH 6.0 und 2 mM CaCl_2 durch Inkubation bei den angegebenen Temperaturen für 10 min. Die Messungen wurden als unabhängige 3-fach Bestimmung durchgeführt.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter kam das spezifische Substratpeptid *Dabcyl-Ser-Phe-EDANS* zum Einsatz. Durch die Spaltung der Peptidbindung zwischen Serin und Phenylalanin wurde die räumliche Nähe zwischen dem Azofarbstoff Dimethylaminoazobenzolcarboxyl (*Dabcyl*) und Ethylendiamino-naphthalinsulfonsäure (*EDANS*) aufgehoben und die gelöschte Fluoreszenz von 8-Aminonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS) messbar. Unter optimalen Bedingungen resultierte die Hydrolyse von *Dabcyl-SF-EDANS* durch 1 nM rTAMP bei Substratkonzentrationen unter 1 μ M in leicht verzögerten *Turnover*-Raten. Ein vorstellbarer Grund für diese Verzögerung könnte eine verlangsamte Freisetzung der Hydrolyseprodukte durch die Protease sein. Die hyperbolische Beschreibung der experimentellen Hydrolysedaten resultierte in einem R^2 von 0.964. Als K_M wurde $8.34 \pm 0.89 \mu\text{M}$ ermittelt (Abbildung 20).

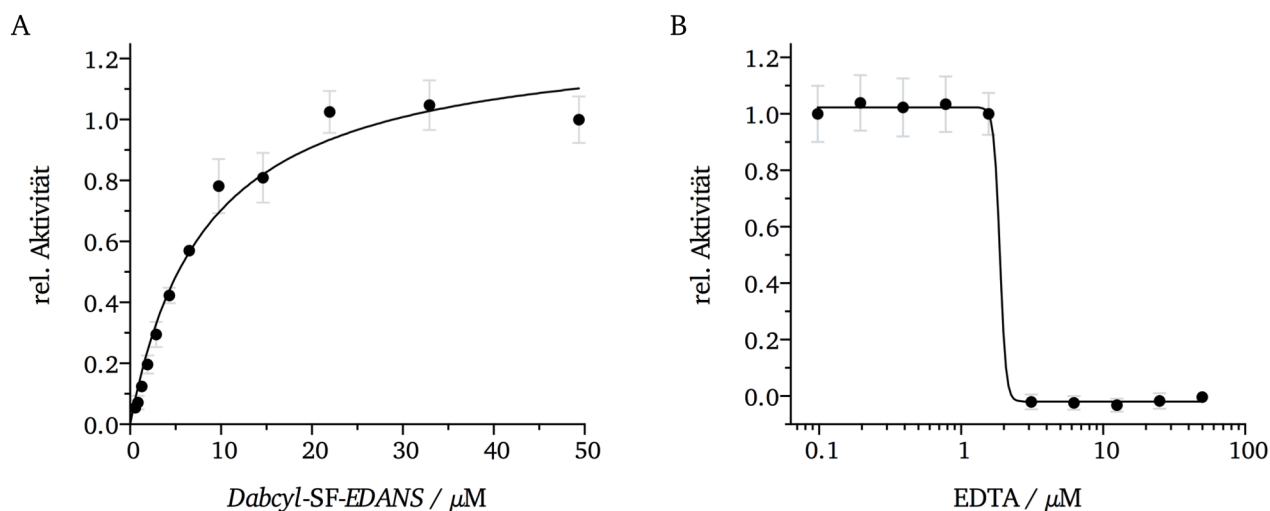


Abbildung 20: Michaelis-Menten-Kinetik und EDTA-Inhibierung von *rTAMP*.

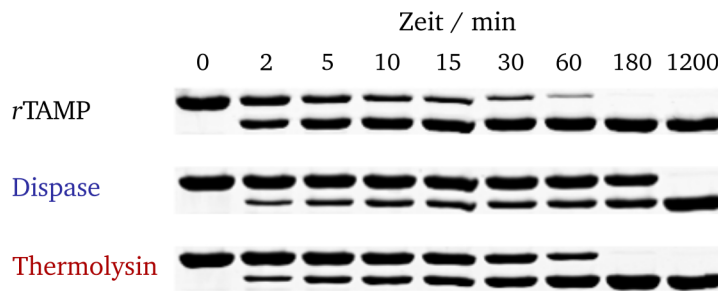
A) Die Hydrolyse von *Dabcyl-SF-EDANS* wurde in 100 mM Tris Acetat pH 6.0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 und 5% DMSO mit 1 nM *rTAMP* zur Ermittlung kinetischen Parameter für das fluorogene Peptidsubstrat durchgeführt. Der hyperbole *Fit* ist als schwarze Linie dargestellt. B) Bestimmung des Einflusses von EDTA auf die *rTAMP*-Aktivität. Die Hydrolyse von 2 μM *Dabcyl-SF-EDANS* in 100 mM Tris Acetat pH 6.0, 100 mM NaCl und 5% DMSO durch 5 nM *rTAMP* wurde in Gegenwart von 0.4 – 50000 nM EDTA verfolgt.

Typisch für Metalloproteasen ist die Inhibierung der proteolytischen Aktivität durch EDTA. EDTA komplexiert dabei die durch das Protein gebundenen zweiwertigen Metallionen. Experimentell wurde für 5 nM *rTAMP* eine Konzentration von 3.1 μM EDTA in Abwesenheit von Ca^{2+} ermittelt, bei der eine vollständige Inhibierung stattfand (Abbildung 20). Die Inhibierung mit einem Überschuss an Zinkionen, wie bspw. für Thermolysin [130] beschrieben, wurde selbst in Gegenwart von 50 mM Zink nicht erreicht. Die Inhibierung von Thermolysin durch einen Überschuss an Zinkionen basiert auf der Bindung eines zweiten Zinkions und einer damit verbundenen Konformationsänderung des Thermolysins. Diese Änderung bewirkt den Ausschluss des Substrates aus dem aktiven Zentrum und somit die Inhibierung der Aktivität. Möglicherweise verhinderte die Konvertase-Domäne die Bindung des zweiten Zinkions. Dafür gibt es aber keinen strukturellen Beweis.

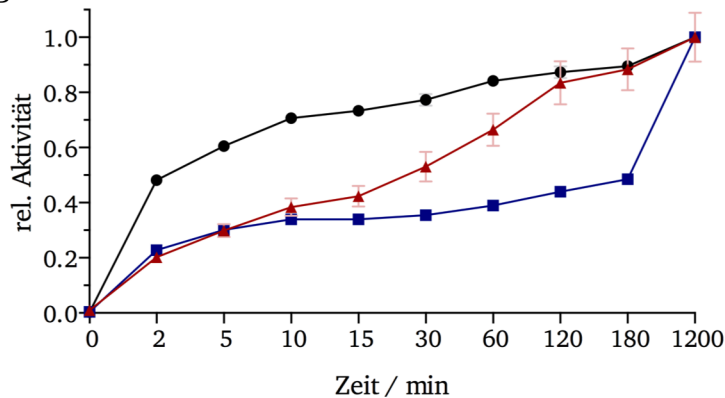
3.2.4. Affinität von *rTAMP* zu *rproMTG*

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen *rproMTG* und *rTAMP* erfolgte die Produktion von rekombinanter *proMTG* nach Marx *et al.* [131]. Die Charakterisierung der Aktivierungsreaktion erfolgte durch die proteolytische Spaltung von *rproMTG* zum reifen Enzym bei pH 6.0 und 30 °C in einem molaren *rTAMP-rproMTG*-Verhältnis von 1:1500. Die fortschreitende proteolytische Spaltung der *rproMTG* wurde zum einen über die Reduktion des Molekulargewichts (SDS-PAGE), zum anderen durch die Zunahme der MTG-Aktivität (Hydroxamsäure-Assay) verfolgt. Die Charakterisierung erfolgte im Vergleich mit den Proteasen Dispase und Thermolysin, den Standardenzymen für die Aktivierung von *rproMTG* zum reifen Enzym.

A



B



C

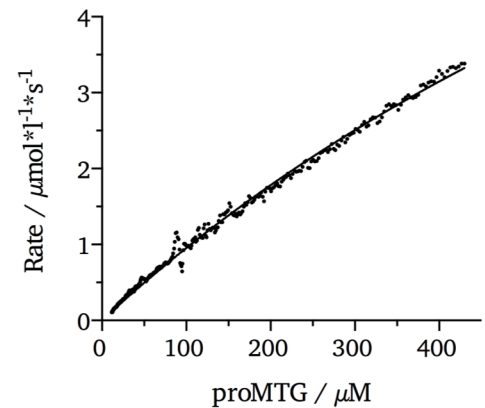
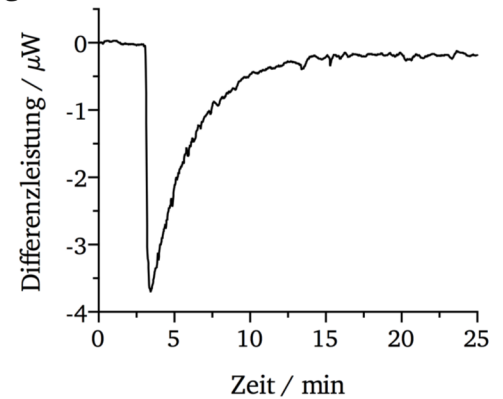


Abbildung 21: Affinität von rTAMP zu rproMTG.

A/B) Aktivierung von 8.64 μM rproMTG durch 5.76 nM rTAMP (schwarze Kreise), Dispase (blaue Rechtecke) oder Thermolysin (rote Dreiecke) bei pH 6.0 und 30 °C für die gezeigten Zeitintervalle. Visualisiert A) mittels 12.5%iger SDS-PAGE und B) Hydroxamsäure-Assay. C/D) Aktivierung von 200 μl 550 μM rproMTG durch 2 μl 10 μM rTAMP bei pH 6.0 und 30 °C verfolgt durch Einzelinjektionskalorimetrie (*single injection calorimetry*). Die generierten Daten wurden mit Graphpad Prism ausgewertet.

Unter den gewählten Bedingungen wurden 50% der rproMTG durch rTAMP bereits nach 2 min aktiviert. Eine nahezu vollständige Prozessierung der rproMTG war nach ca. 1 h zu beobachten. Eine weitere Inkubation bis zu 20 h zeigte in der SDS-PAGE keinen weiteren Abbau der reifen MTG durch rTAMP (Abbildung 21), wie eine HPLC ESI-MS bestätigte (Anhang Daten-DVD). Die Prozessierung von MTG durch Dispase und Thermolysin verlief im Vergleich zu rTAMP signifikant langsamer (Abbildung 21). Interessanter Weise wird bei der proteolytischen Aktivierung durch rTAMP und Dispase eine Verlangsamung der Aktivierung mit zunehmender Menge an reifer MTG erkennbar. Dieser Effekt wird vermutlich durch das MTG-Propeptid ausgelöst. Freies Propeptid weist eine hohe Affinität zu reifer MTG auf und führt so zu einer Inhibierung der reifen MTG [132]. Bei der Fragmentierung und Inaktivierung des inhibierenden Propeptids durch die Protease kommt es zur Bindung an Proteasemoleküle. Das Propeptid ist damit eine Zeit lang ein kompetitiver Inhibitor der MTG-aktivierenden Proteasen. Dieser Effekt äußert sich für Thermolysin stärker als für die Dispase und rTAMP

Die rekombinante Produktion der proMTG ermöglichte die Bereitstellung ausreichender Mengen an Protein für die kinetische Untersuchung der proteolytischen Spaltung der rproMTG zum reifen Enzym durch Kalorimetrie. Es erfolgte eine Einzelinjektionskalorimetrie bei pH 6.0 und einem molaren rTAMP-rproMTG-Verhältnis von 1:5500 bei 30 °C. Dabei wurden zu 200 μ l einer 550 μ M rproMTG-Lösung 2 μ l eine 10 μ M rTAMP Lösung titriert und die Daten der exergonen Reaktion ausgewertet. Bei dieser Methode erfolgt die Messung der Wärmeentwicklungsrate bei der Spaltung des Substrates zum Produkt. Die gemessene Wärme (Q) wird als Funktion der Zeit (Δt) gemessen und ist als thermale Leistung definiert (Leistung = $\Delta Q / \Delta t$). Die Menge an Wärme korreliert dabei mit der Stoffmenge an Produkt, wodurch sich die Umsatzrate ermitteln lässt. Die Auswertung der Funktion der Rate über die Substratkonzentration ermöglichte die Bestimmung der kinetischen Parameter [113]. Die experimentellen Daten ergaben einen K_M von 1.31 ± 0.05 mM und ein k_{cat} von 135 ± 4.3 s⁻¹. Entsprechend resultierte daraus eine katalytische Effizienz von 103053 M⁻¹ s⁻¹.

3.3. Rekombinanter *Streptomyces* Subtilisin und TAMP Inhibitor (rSSTI)

Der doppelköpfige Inhibitor SSTI besitzt wie zuvor beschrieben inhibitorische Aktivität gegenüber der Metalloprotease TAMP sowie der Serinprotease Subtilisin. Weiterhin ist er ein Substrat von MTG. Für die Untersuchung der Interaktion des Inhibitors mit TAMP und MTG wurde die rekombinante Produktion sowie ein Verfahren zur Einführung von Punktmutationen und N-terminalen Modifikationen etabliert.

3.3.1. Reinigung von rSSTI

Für die rekombinante Produktion von SSTI wurden *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen mit dem Plasmid pET22b(+)-SSTI_{opt} transformiert. Die Proteinexpression erfolgte in 1 l LB-Medium über 5 h bei 28 °C nach Induktion mit 1 mM IPTG. Nach Zellernte, Ultraschallaufschluss und pH-Präzipitation von *E. coli*-Proteinen bei pH 5.3 begann die chromatographische Reinigung des rSSTI bei RT. Im Folgenden sind die Einzelschritte der chromatographischen Reinigung beschrieben. Der Überstand nach Präzipitation von *E. coli*-Proteinen bei pH 5.3 wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min über eine 30 ml Fractogel-EMD-SO₃⁻-Säule (Merck) chromatographisch gereinigt (Abbildung 22).

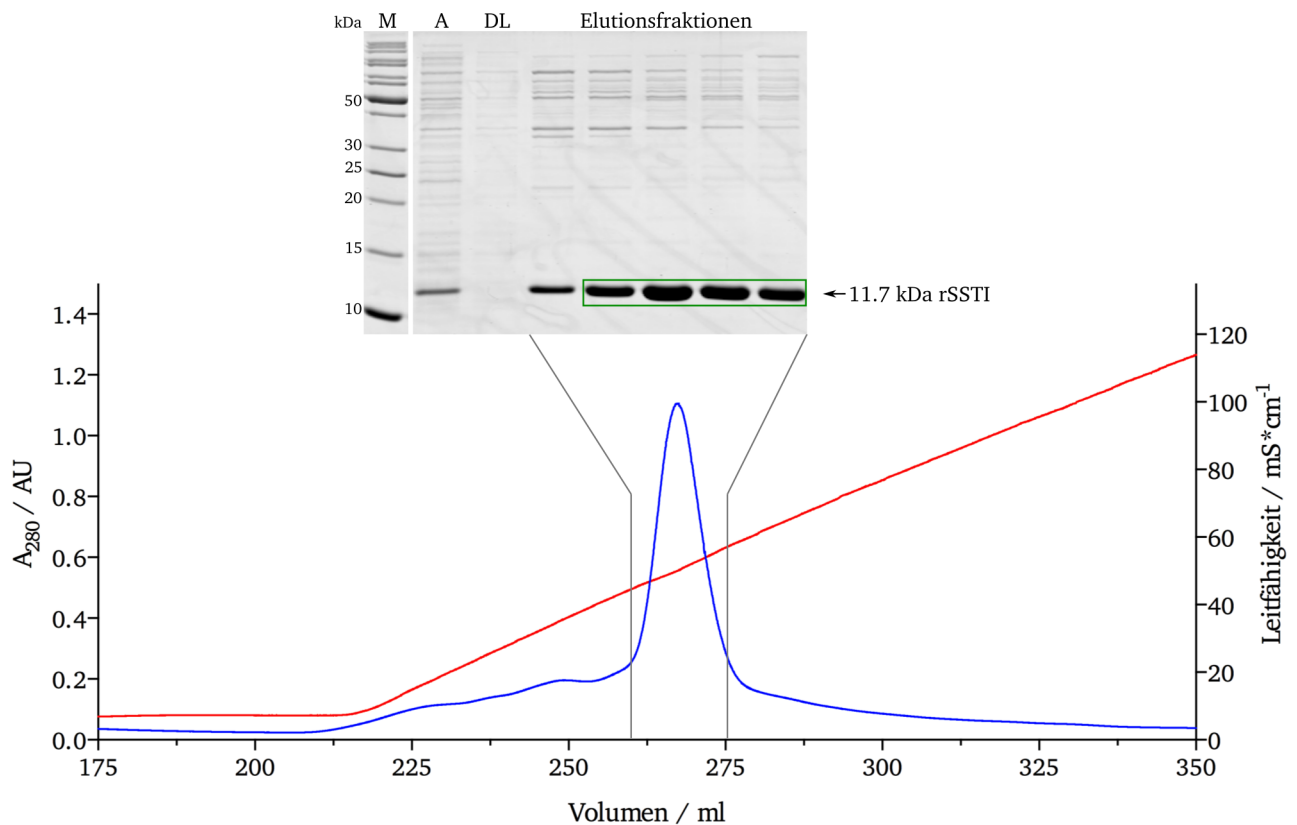


Abbildung 22: Chromatogramm und SDS-PAGE der IAC von rSSTI.

Die Reinigung des Überstands einer pH-Fällung erfolgte mit einer 30 ml Fractogel-EMD-SO₃⁻-Säule (Merck) bei RT und einer Flussrate von 2 ml/min mit einem linearen Salzgradient von 0 – 1 M in 50 mM Na Acetat pH 5.3. Die Leitfähigkeit ist als rote Linie und die Proteinabsorption bei 280 nm als blaue Linie dargestellt. Im Anschluss an die IAC folgte die Analytik mittels 15%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Für die Größenzuordnung wurde ein Molekulargewichtsmarker (M) mitgeführt. Der Auftrag (A) und die nicht bindenden Proteine als Durchlauf (DL) sind gekennzeichnet. Vereinigte Fraktionen sind durch einen grünen Kasten markiert.

Die IAC ermöglichte, wie die Elektrophorese zeigt (Abbildung 22), in erste Linie die Abreicherung restlicher *E. coli*-Proteine (> 20 kDa), welche bei pH 5.3 nicht präzipitierten. Fraktionen mit entsprechender Reinheit wurden vereinigt und mit Hilfe von Zentrifugationskonzentratoren für die anschließende GPC auf ca. 1 ml eingengt.

Das Konzentrat der IAC wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min über eine 120 ml Superdex 75 pg HiLoad 16/600-Säule (GE Healthcare) chromatographisch gereinigt. Die GPC diente der finalen Abtrennung hochmolekularer *E. coli*-Proteinen sowie der Umpufferung in den Lagerpuffer (Abbildung 23).

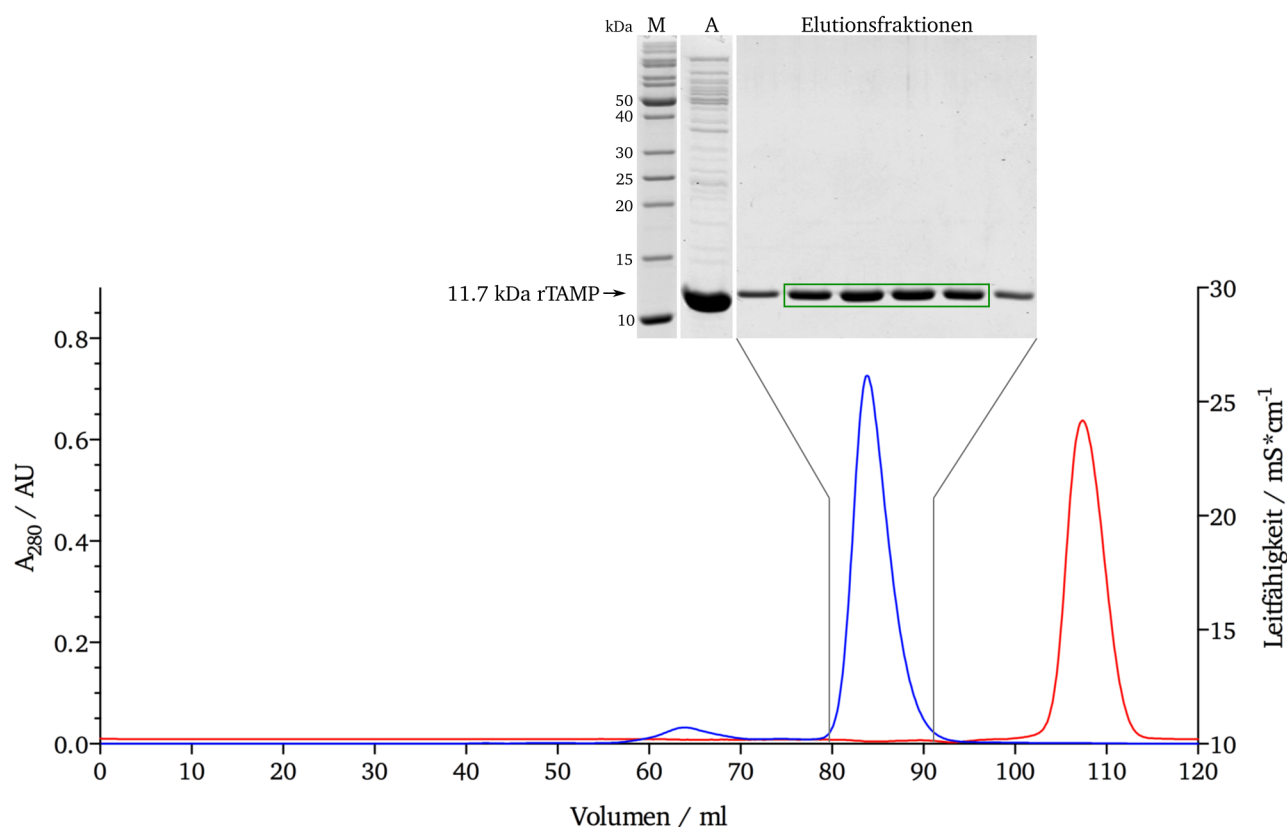


Abbildung 23: Chromatogramm und SDS-PAGE der GPC von *rSSTI*.

Die Reinigung des Konzentrates der IAC erfolgte mit einer 120 ml Superdex 75 pg *HiLoad* 16/600-Säule (GE Healthcare) bei RT und einer Flussrate von 1 ml/min in 20 mM Hepes NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl. Die Leitfähigkeit ist als rote Linie und die Proteinabsorption bei 280 nm als blaue Linie dargestellt. Die Analytik erfolgte mit 15%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Für die Größenordnung wurde ein Molekulargewichtsmarker (M) mitgeführt. Der Auftrag (A) ist gekennzeichnet und vereinigte Fraktionen sind durch einen grünen Kasten markiert.

Die Analytik mittels SDS-PAGE zeigte die vollständige Reinigung von *rSSTI* mit einer apparenten Molmasse von ca. 12 kDa. Im Vergleich dazu ergab das GPC-Elutionsvolumen von 83.7 ml eine apparente Molmasse von 16.5 kDa. Damit wurde das theoretische Molekulargewicht eines *rSSTI*-Monomeres von 11.7 kDa deutlich überschritten. Für Mitglieder der SSI-Familie ist jedoch bekannt, dass sie Homodimere ausbilden [93]. Eine exaktere Bestimmung der Molmasse ist nachfolgend bei der Charakterisierung von *rSSTI* beschrieben (Abschnitt 3.3.2). Fraktionen mit einer Reinheit größer 95% wurden vereinigt und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung erfolgte nach Einfrieren in flüssigen Stickstoff bei -80 °C. Für *rSSTI* aus *E. coli* BL21 (DE3) pLys pET22b(+)-*SSTI*_{opt} ergab sich abhängig von der produzierten *rSSTI*-Variante aus 1 l Anzuchtvolumen eine Ausbeute von 1 – 10 mg.

Die Reinigung von *wtSSTI* aus *S. mobaraensis* (*Sm-SSTI*) erfolgte nach Schmidt *et al.* 2008 [89] mit abschließender GPC in 20 mM Hepes NaOH pH 8.0 und 100 mM NaCl.

3.3.2. Komplexierungsverhalten von *rSSTI* und *rTAMP*

Für den Nachweis der Dimerisierung von *rSSTI* sowie der Komplexbildung von *rSSTI* mit *rTAMP* wurde eine analytische GPC durchgeführt. Die Komplexbildung erfolgte durch Inkubation der Komplexpartner bei pH 8.0 und 4 °C für 10 min. Die anschließende Trennung über eine analytische GPC ergab die Ausbildung unterschiedlicher Aggregate. Die bei der präparativen GPC bereits beobachtete Dimerisierung von *rSSTI* (Abschnitt 3.3.1) wurde bestätigt (Abbildung 24). Die analytische GPC ermittelte für das *rSSTI*-Dimer eine apparente Molmasse von 17.9 kDa, was im Vergleich zur präparativen GPC (16.5 kDa) deutlich näher an der theoretischen Molmasse eines *SSTI*-Dimers von 23.4 kDa liegt. Für die *rTAMP* ergab sich eine relative Molmasse von 55.1 kDa was eine Abweichung von der theoretischen molaren Masse des Monomers von ca. 1 Prozent (0.6 kDa) bedeutete. Die äquimolare Zugabe von *rSSTI* zu *rTAMP* führte zur Ausbildung eines Heterotetramers mit einer relativen Molmasse von 133.1 kDa bei einer theoretischen Molmasse von 128.1 kDa. Damit kommt es zu einer ähnlichen Bindung von zwei Protease-Molekülen an das Inhibitor-Dimer, wie dies bereits bei *SSI* von *Streptomyces albogriseolus* (P01006) beobachtet wurde [93, 133, 134]. Eine Verdopplung oder Verdreifachung der *rSSTI*-Konzentration führte zum Auftreten eines Komplexes mit einer relativen Molmasse von 62.5 kDa, die ein Heterodimer aus *rTAMP* und *rSSTI* anzeigte. Der Überschuss an *rSSTI* führt somit zu einer teilweisen Auflösung des Dimerkomplexes zwischen den *rSSTI*-Molekülen im Tetramerkomplex. Freier *rSSTI* zeigte im gleichen Ansatz jedoch weiterhin die erwartete Homodimerbildung.

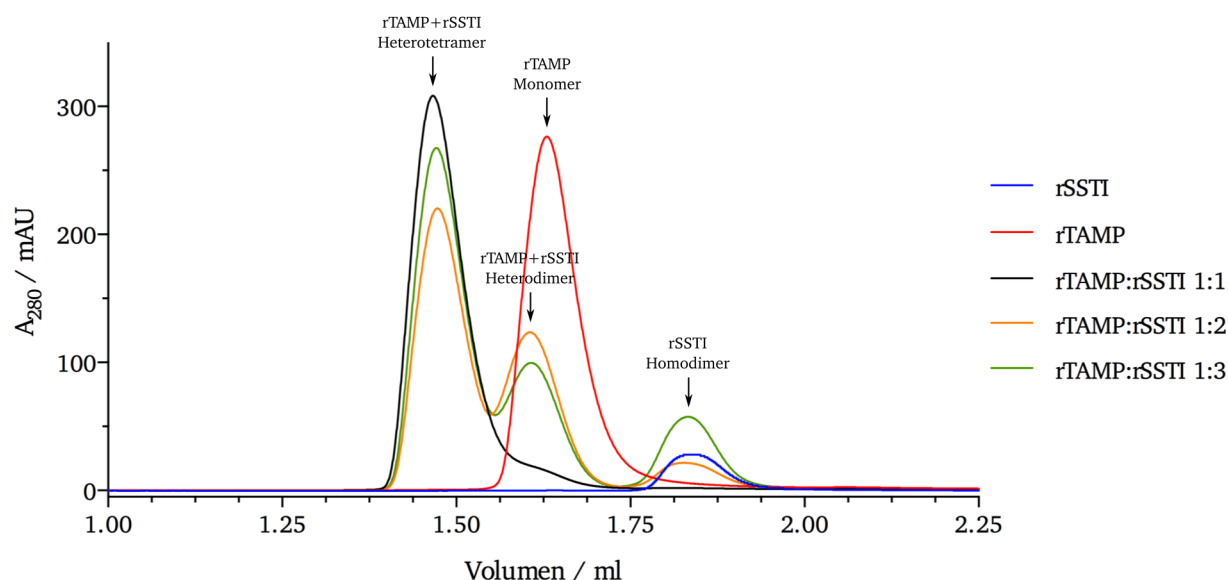


Abbildung 24: Komplexbildung von *rTAMP* und *rSSTI* angezeigt durch analytische GPC.

Analytik von *rTAMP* und *rSSTI* (je 0.25 nmol) über eine Superdex 200 Increase 3.2/300-Säule (GE Healthcare) bei einer Flussrate von 0.075 ml/min in 20 mM Hepes NaOH pH 8.0 mit 100 mM NaCl. Zur Komplexbildung wurden beide Proteine in den angegebenen Verhältnissen gemischt und nach zehnminütiger Inkubation auf Eis über die Säule analysiert.

Für die kinetische Beschreibung der Interaktion von *r*SSTI und *r*TAMP erfolgte eine isothermale Titration von 7.5 μM *r*TAMP mit 100 μM *r*SSTI bis zu einem 2.5-fachen molaren Überschuss an *r*SSTI (Abbildung 25). Die durch die Komplexbildung notwendige Leistung zum Ausgleich der Wärmeenergie zwischen Referenz- und Messzelle ermöglicht die Beschreibung der thermodynamischen Parameter dieser Bindung. Die exergone Reaktion wird getrieben durch eine negative Enthalpie ΔH von $-74.6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die hohe Affinität des *r*SSTI zur *r*TAMP wird durch einen K_d -Wert von $\leq 1 \text{ nM}$ deutlich. Die ITC bestätigt das durch die analytische GPC gezeigte äquimolare Bindungsverhalten gegenüber *r*TAMP. Der Nachweis der inhibitorischen Aktivität von *r*SSTI auf *r*TAMP erfolgte anschließend durch kompetitive Inhibierung von 5 nM TAMP mit unterschiedlichen Konzentrationen an *r*SSTI in Gegenwart von 2 μM *Dabcyl-SF-EDANS* bei 30 °C. Es wurde ein IC_{50} (13.7 nM) im unteren nanomolaren Bereich ermittelt, der die hohe Affinität des *r*SSTI zur *r*TAMP belegt.

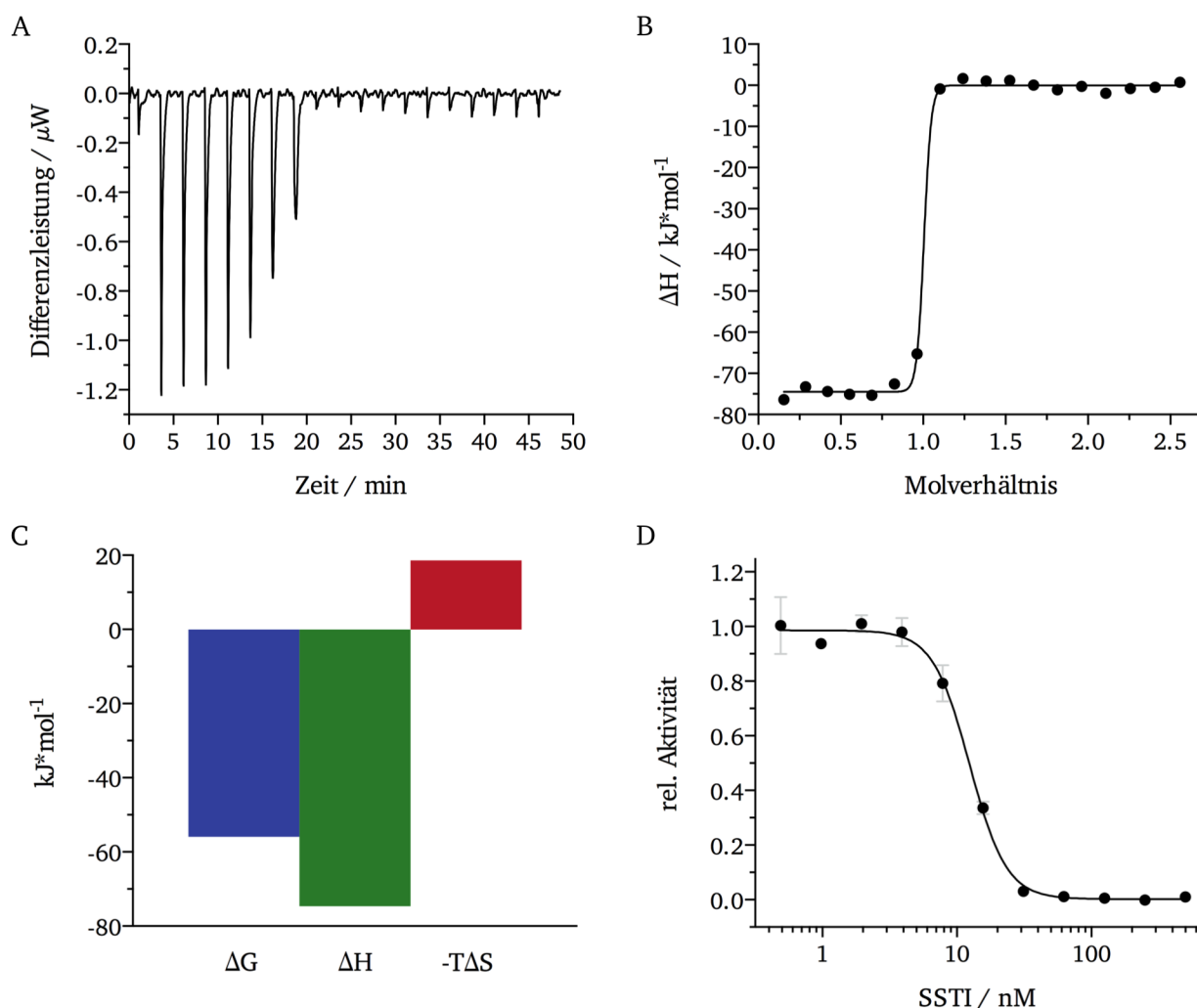


Abbildung 25: ITC und Inhibierung von *r*TAMP mit *r*SSTI.

A-C) Injektionskalorimetrie von 7.5 μM *r*TAMP in 20 mM Hepes NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl mit 100 μM *r*SSTI bis zu einem 2.5-fachen molaren Überschuss an *r*SSTI bei 30 °C. A) Durch die Titration hervorgerufene Differenzleistung zwischen Mess- und Referenzzelle der ITC. B) Thermodynamische Beiträge einer Bindung von *r*SSTI an *r*TAMP. C) Darstellung der ermittelten thermodynamischen Parameter. D) Bestimmung des inhibitorischen Einflusses von *r*SSTI auf die *r*TAMP-Aktivität. Die Hydrolyse von 2 μM *Dabcyl-SF-EDANS* in 100 mM Tris Acetat pH 6.0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 und 5% DMSO durch 5 nM *r*TAMP wurde in Gegenwart von 0.5 – 500 nM *r*SSTI verfolgt.

Die Grundlage für die Untersuchung der Bindestelle von *rTAMP* an *rSSTI* und für den Austausch von Aminosäuren waren zum einen die identifizierten Bindestellen des SSI (P01006) aus *S. albobrisesolus* an Subtilisin [92, 135] und zum anderen die Bindestellen des ScNPI (Q9FDS0) aus *S. caespitosus* an Subtilisin und die neutrale Metalloprotease ScNP1 aus *S. caespitosus* [95]. Weiterhin erfolgte ein Sequenzvergleich von SSTI (P83544, *S. mobaraensis*) mit anderen SSI- und SIL-Varianten (Abbildung 26), um Rückschlüsse auf strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu ermöglichen.

[illegible][illegible]

Alignment des SSTI (*S. mobaraensis*) mit A) ausgewählten *Streptomyces* Subtilisin Inhibitoren und B) dem *Streptomyces* Metalloprotease-Inhibitor von *S. caespitosus*. Der Abgleich wurde mit Clustal Ω V 1.2.4 erstellt. 1, P83544, *S. mobaraensis* DSM40847; 2, B1VRG2, *S. griseus* subsp. *griseus* IFO 13350; 3, P01006, *S. albogriseolus*; [91] 4, C9Z0C9, *S. scabiei*; 5, Q825H1, *S. avermitilis*; 6, K4QWL8, *S. davawensis*; 7, P61152, *S. coelicolor* A3(2); 8, Q9FDS0 *S. caespitosus* (*Streptomyces* sp. I-355). Mit dem SignalP 4.1 Server ermittelte Signalsequenzen [136] sind in grün gekennzeichnet, aromatische Aminosäuren in blau und Glutamine in rot. Durch Edman-Abbau bestimmte Sequenzen sind rot unterstrichen. Die ermittelten möglichen Bindestellen für Subtilisin und die *S. caespitosus* Metalloprotease sind mit gelben Boxen gekennzeichnet.

Schnittstellen prognostiziert. Eine Schnittstelle befindet sich nach Ala28 (~ASA/TPA~) sowie eine weitere nach Ala35 (~APA/AQQ~). Es stellte sich die Frage, ob die Länge des *N*-Terminus einen Einfluss auf die inhibitorische Funktion gegen über TAMP und/oder Subtilisin sowie auf die Markierbarkeit des SSTI durch MTG hat.

3.3.4. Bestimmung der TAMP-Inhibierungsstelle am SSTI

Die rekombinante Produktion und Reinigung der SSTI-Varianten erfolgte analog zum rekombinanten *wt*SSTI. Um die strukturelle Integrität jeder Variante zu beurteilen, wurden ihr GPC-Elutionsverhalten und ihr Schmelzpunkt herangezogen. Alle Varianten hatten ein ähnliches Elutionsvolumen wie SSTI aus *S. mobaraensis* (*Sm*-SSTI). Die eingeführten Mutationen hatten daher keine Auswirkung auf die Dimerbildung der Varianten. Die thermische Analytik zeigte, dass nur die kürzeste Variante (Δ SLYAP-*r*SSTI) einen um 10 °C niedrigeren Schmelzpunkt im Vergleich mit *Sm*-SSTI aufwies. Diese Variante wurde daher nicht für die Charakterisierung des SSTI herangezogen.

Für die Identifikation der TAMP-Bindestelle am SSTI wurden spezifische Aminosäuren anhand der in der Literatur beschriebenen Interaktionsstellen ausgetauscht. Allerdings zeigte der Austausch von Aminosäuren in der Subtilisin-affinen SSI-Met104-Region (Tabelle 12) nur einen geringen Einfluss auf die Bindung von SGMPII [94]. Die Substitution des ScNP1-affinen ScNPI-Tyr61 gegen Pro reduzierte demgegenüber die Bindung an ScNP1 vollständig. Auch der Austausch von Met99 gegen Lysin führte erwartungsgemäß zum Verlust der inhibitorischen Aktivität gegenüber Subtilisin [95]. Diese Ergebnisse unterstützten die Vermutung, dass SSTI eine alternative TAMP-Bindungsstelle besitzt (Tabelle 12).

Um den Einfluss beider potentiellen Bindemotive zu untersuchen, wurden die Aminosäuren Met70 und Lys72 sowie Lys108 und Glu109 des SSTI durch verschiedene Aminosäuren ersetzt (Tabelle 12). Die inhibitorische Aktivität der modifizierten Proteine wurde mit *r*TAMP und Subtilisin ohne Vorinkubation durch Spaltung der spezifischen Substratpeptide *Dabcyl*-Ser-Phe-EDANS und *Succinyl*-Ala-Ala-Pro-Phe-*pNA* bei 30 °C charakterisiert. Wie erwartet wurde kein Einfluss der vorgenommenen SSTI-Mutationen auf die Inhibierung von *r*TAMP beobachtet. Aufgrund der großen Ähnlichkeit des SSTI auf Primärsequenzebene und des konservierten Auftretens aromatischer und aliphatischer Aminosäuren wurde die Tertiärstruktur des SSI (PDB: 3SSI) herangezogen, um mögliche Interaktionsstellen zu identifizieren. Jedoch erschien keine der aromatischen bzw. aliphatischen Aminosäuren als für die Interaktion mit dem aktiven Zentrum von Metalloproteasen geeignet. Das Gleiche galt für den C-Terminus, welcher über konservierte Phenylalanine an einem β -Faltblatt der Dimerisierungsgrenzfläche fixiert ist. Daraufhin konzentrierten sich die Untersuchungen auf den flexiblen *N*-Terminus, welcher ein konserviertes Leu40-Tyr41-Motiv aufweist. Der Austausch des SSTI-Tyr41 durch kleine und geladene Aminosäuren blieb ohne signifikanten Effekt (Tabelle 12). Jedoch

reduzierte eine Verlängerung des *N*-Terminus um sechs AS die inhibitorische Aktivität gegenüber *r*TAMP erheblich. Die stückweise Kürzung dieser Peptidverlängerung um jeweils 3 AS bis auf die Länge des *wt*SSTI-*N*-Terminus stellte die inhibitorische Aktivität wieder vollständig her. Diese Beobachtung legte den Einfluss des *N*-Terminus auf die inhibitorische Aktivität des SSTI im Bezug auf die TAMP nahe. Daher folgte eine weitere Kürzung des *N*-Terminus, jetzt aber durch Entfernung einzelner AS (Abbildung 27). Die Elimination von Ser39 zeigte noch keinen Einfluss auf die Aktivität. Jedoch reduzierte sich die inhibitorische Aktivität um zwei Größenordnungen nach Entfernung des Leu40. Die weitere Kürzung durch Abtrennen des Tyr41 führte zur vollständigen Inaktivierung des SSTI als TAMP-Inhibitor.

Tabelle 12: Inhibierung von TAMP und Subtilisin durch SSTI-Varianten

Protein	Aminosäure-sequenz	Schmelzpunkt °C	IC ₅₀ ¹ TAMP nM	IC ₅₀ ² Subtilisin nM
<i>r</i> SSTI (wt)	SLYAPSAL~	72,9	13.7 ± 0.5	157.9 ± 2.3
<i>Sm</i> -SSTI (wt) ³	-	73.1	30.1 ± 1.7	160.3 ± 2.7
3AS- <i>r</i> SSTI	AQQSLYAPSAL~	73.1	63.9 ± 3.2	137.6 ± 2.2
6AS- <i>r</i> SSTI	APAAQQSLYAPSAL~	72.8	107.5 ± 6.7	134.2 ± 2.4
Y41A	SLAAPSAL~	72.2	22.4 ± 1.4	130.3 ± 2.5
Y41R	SLRAPSAL~	72.5	33.5 ± 1.8	144.9 ± 2.6
M70S	~LNCSPKP~	75.4	10.3 ± 0.3	199.8 ± 3.1
K72E	~CMPESP~	75.1	14.1 ± 0.7	160.2 ± 2.9
K72R	~CMPRPS~	72.7	12.5 ± 0.6	216.0 ± 2.9
K72S	~CMPSP~	73.2	14.5 ± 0.6	119.7 ± 2.2
K108A	~ACTAEWN~	72.5	19.0 ± 0.7	97.1 ± 1.5
E109A	~CTKA~	69.8	13.8 ± 0.5	244.3 ± 3.6
K108A E109A	~CTAA~	69.5	13.7 ± 0.4	134.0 ± 2.1
Δ <i>S</i> - <i>r</i> SSTI	-LYAPSAL~	72.9	15.5 ± 0.8	170.8 ± 2.5
Δ <i>SL</i> - <i>r</i> SSTI	--YAPSAL~	73.0	2279 ± 540	141.1 ± 2.2
Δ <i>SLY</i> - <i>r</i> SSTI	---APSAL~	71.9	keine Inhibition	119.8 ± 1.8
Δ <i>SLYAP</i> - <i>r</i> SSTI	----SAL~	63.0	keine Inhibition	154.1 ± 3.4

¹ Die Aktivität wurde in Dreifachbestimmung durch *r*TAMP-Hydrolyse von *Dabcyl*-Ser-Phe-EDANS ermittelt. ² Messung der Subtilisin abhängigen Hydrolyse von *Succinyl*-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in Dreifachbestimmung. ³ Die genaue Bestimmung des *N*-Terminus war nicht möglich, da die Isolierung aus dem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* erfolgte.

Da selbst bei den sehr hohen Konzentrationen von 50 μ M Δ*SL*-*r*SSTI keine vollständige Inhibierung der *r*TAMP erfolgte und auch der Austausch von Tyr41 keinen Aktivitätsverlust nach sich zog, ist davon auszugehen, dass nur das vollständige SSTI-Sequenzmotiv Leu40-Tyr41 die Blockade von *r*TAMP ermöglicht.

Im Gegensatz zur Inhibierung der *rTAMP* hatten die vorgenommenen Änderungen in der SSTI-Struktur keine signifikante Auswirkung auf die Subtilisin-Inhibierung. Die Einführung von Punktmutationen hatte selbst auf die für andere SSI's wichtige Interaktionsposition im Bereich des SSTI-Lys108 nur geringe Auswirkungen. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Interaktion mit Subtilisin über andere Interaktionspunkte erfolgt, andere AS-Reste die Interaktion steuern oder ein Motiv aus mehreren AS die Wechselwirkung ermöglicht. Untersuchungen von Kojima *et al.* legen nahe, dass die Bindung des Inhibitorproteins SSI von *S. albobruseolus* an Subtilisin sehr stark durch die benachbarten Aminosäuren, die an das bindungsaktive Methionin angrenzt, beeinflusst wird. Punktmutationen zeigten ebenfalls nur einen geringen Einfluss auf die Bindung an Subtilisin [137, 138]. Die *N*-terminale Verlängerung oder Kürzung des SSTI blieb ebenfalls ohne Effekt auf die Subtilisin-Inhibierung. Eine weitere Untersuchung der Subtilisin-Bindestelle am SSTI erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht.

Die isothermale Titration der *rTAMP* mit *rSSTI*-Varianten bestätigte abschließend den erheblichen Einfluss des *N*-Terminus auf die Bindungsaffinität gegenüber *rTAMP*. Dabei wirkte sich sowohl die Verlängerung als auch die Einkürzung des *N*-Terminus auf das Bindeverhalten negativ aus (Abbildung 27).

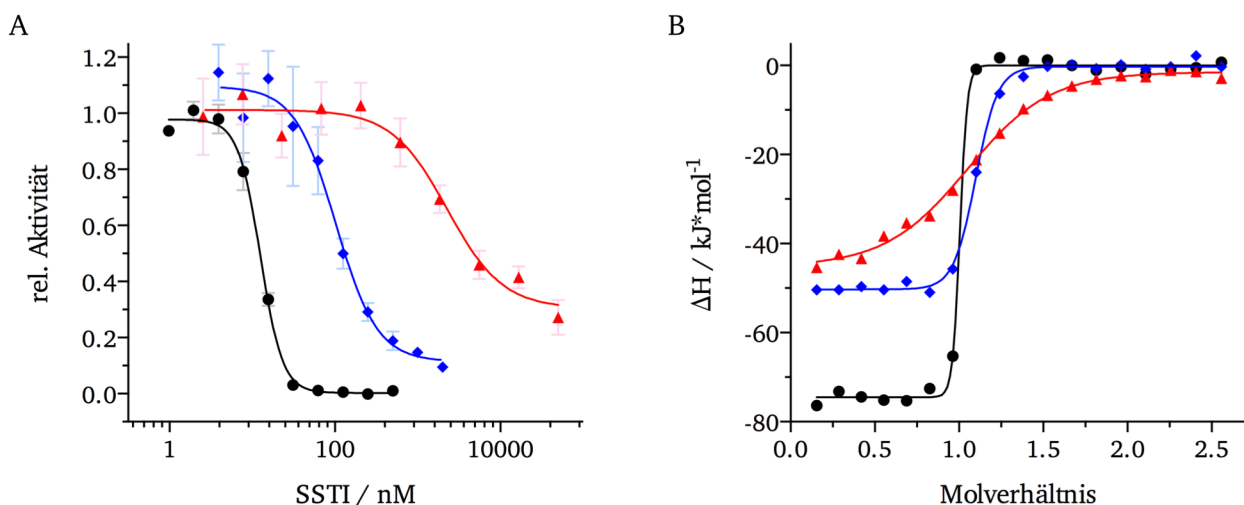


Abbildung 27: ITC und Inhibierung von *rTAMP* mit *N*-terminal modifizierten *rSSTI*-Varianten.

Einfluss der *N*-terminalen Modifizierung auf die Bindung von *rSSTI* an *rTAMP*. Gezeigt sind der rekombinante *wtSSTI* (schwarze Kreise), die *N*-terminal verlängerte Variante APAAQQ-*rSSTI* (blaue Rechtecke) und der *N*-terminal verkürzte Δ SL-*rSSTI* (rote Dreiecke). A) Bestimmung des inhibitorischen Einflusses von *rSSTI* auf die *rTAMP*-Aktivität. Die kompetitive Hydrolyse von 2 μM *DabcyI-SF-EDANS* in 100 mM Tris Acetat pH 6.0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 und 5% DMSO durch 5 nM *rTAMP* wurde in Gegenwart von 0.5 – 50000 nM *rSSTI* verfolgt. B) Injektionskalorimetrie von 200 μl 7.5 μM *rTAMP* in 20 mM Hepes NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl mit je 2 μl 100 μM *rSSTI* bis zu einem 2.5fachen molaren Überschuss an *rSSTI* bei 30 °C.

Die isothermale Titration von *rSSTI* zu *rTAMP* zeigte, dass die Bindung des *rSSTI* an die *rTAMP* enthalpisch getrieben ist. Die Interaktion beider Proteine ist so affin, dass die Detektionsgrenze der ITC erreicht wurde ($K_d < 1 \text{ nM}$). Daher können für die affinsten Varianten auch nur Grenzen für den K_d , ΔG und $-T\Delta S$ angegeben werden. Für den rekombinanten *wtSSTI* ergibt sich mit einer Enthalpie von

-74.6 ± 0.7 kJ/mol die größte Enthalpieänderung aller Varianten, wobei die negative Entropie den in der freien Energie ausgedrückten Energiegewinn beträchtlich reduziert. Durch die Verlängerung des Terminus um drei AS wies die Bindung eine um ca. 25 kJ/mol verringerte Enthalpie auf. Die Reaktionswärme ΔG hingegen blieb durch den geringeren Entropieanteil unverändert. Eine weitere Verlängerung auf sechs AS ergab ähnliche thermodynamische Daten, nur nahm die Entropie weiter zu. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Hydrophobizität des zusätzlichen Peptids zurückzuführen, dessen Kontakt mit Wasser durch die Bindung von SSTI an *rTAMP* reduziert wird. Im Vergleich mit dem verlängerten *N*-Terminus hatte die Verkürzung einen erheblich größeren Einfluss. Die Entfernung des *N*-terminalen Ser39 zeigte wie zuvor nur einen geringen Einfluss auf die thermodynamischen Parameter der Bindung. Die weitere Einkürzung hingegen verdeutlicht die Wichtigkeit des Leu40-Tyr41-Motivs für das Bindeverhalten. Das Entfernen des Leu40 führt zu einer Verringerung von ΔH um ca. 28 kJ/mol und einen 400-fach höheren K_d -Wert. Das weitere Einkürzen um das Tyr41 verhindert die Ausbildung einer Bindung und daher, wie durch die Aktivitätstests gezeigt, die Inhibierung der *rTAMP* durch den Δ SLY-SSTI (Tabelle 13).

Tabelle 13: Thermodynamische Parameter *N*-terminal veränderter *rSSTI*-Varianten.

Protein	Aminosäure-sequenz	K_d^1 nM	ΔG kJ/mol	ΔH^1 kJ/mol	-T ΔS kJ/mol
6AS- <i>rSSTI</i>	APAAQQSLYAPSAL~	17.4 ± 4.0	-45.1	-50.7 ± 0.7	5.67
3AS- <i>rSSTI</i>	AQQSLYAPSAL~	< 1.0	< -52.2 ²	-47.7 ± 0.3	< -4.5 ²
<i>rSSTI</i>	SLYAPSAL~	< 1.0	< -52.2 ²	-74.6 ± 0.7	< 22.6 ²
Δ S- <i>rSSTI</i>	-LYAPSAL~	2.5 ± 0.8	-50.0	-69.6 ± 0.5	19.6
Δ SL- <i>rSSTI</i>	--YAPSAL~	401.0 ± 68.5	-37.2	-46.7 ± 1.5	9.51
Δ SLY- <i>rSSTI</i>	---APSAL~	keine Bindung			

¹ Injektionskalorimetrie von 200 μ l 7.5 μ M *rTAMP* in 20 mM Hepes NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl mit je 2 μ l 100 μ M *rSSTI* bis zu einem 2.5-fachen molaren Überschuss an *rSSTI* bei 30 °C. ² Berechneter Wert aufgrund des Detektionslimits der ITC bezogen auf einen K_d Wert von 1 nM und der gemessenen ΔH .

Inhibierung und thermodynamische Signatur weisen auf einen Regulationsmechanismus hin, der die Interaktion von *rTAMP* und *rSSTI* steuert. Kommt es *in vivo* zu einer *N*-terminalen Verkürzung von SSTI und damit zum Verlust von Leu40-Tyr41, verliert SSTI seine inhibitorische Wirkung. Ein Beispiel für solch eine proteolytische Kürzung ist die Entfernung des Tetrapeptides FRAP bei der TAMP-aktivierten Transglutaminase durch eine Prolyl-tri/tetrapeptidyl-Aminopeptidase (PTP-SM P83615) (Abschnitt 1.2.2). Eine ähnliche Modifizierung ist für den SSTI vorstellbar. In diesem Fall regelt PTP-SM nicht nur die inhibitorische Aktivität von SSTI sondern auch die Aktivität von TAMP und MTG im Lebenszyklus von *S. mobaraensis*.

3.3.5. Glutaminbindestelle von SSTI für MTG

In vorangegangenen Arbeiten wurde der wtSSTI aus *Streptomyces mobaraensis* bereits auf seine Substrateigenschaften gegenüber MTG untersucht [89]. Diese Arbeiten zeigten, dass SSTI ein Glutaminsubstrat ist. Die zugänglichen Glutamine, die für die Vernetzung mit MTG verantwortlich sind, wurden jedoch nicht identifiziert. Untersuchungen durch Schmidt *et al.* 2008 [89] zeigten weiterhin, dass die Markierbarkeit von SSTI-Glutaminen mit steigender Kultivierungsdauer verloren geht, gleichzeitig jedoch die lysinseitige Markierbarkeit über die gesamte Kultivierungszeitraum unverändert erhalten bleibt. Diese Beobachtung wurde mit der Abnahme der Anzahl an reaktiven Glutaminen durch Seitenkettenhydrolyse erklärt.

Der Sequenzvergleich unterschiedlicher SSI-Varianten hinsichtlich der Substrateigenschaften für MTG zeigt, dass der SSTI aus *S. mobaraensis* mit sechs Glutaminen die höchste Anzahl an Glutaminen besitzt (Abbildung 26). Des Weiteren besitzt das Protein als einziges der betrachteten Varianten ein N-terminales Doppel-Gln. Neben der durch Schmidt *et al.* vermuteten intramolekularen Quervernetzung oder Deamidierungsreaktion durch Hydrolyse zu Glutamaten während einer Submerskultivierung von *S. mobaraensis* war nach Untersuchung der TAMP-Bindestelle eine N-terminale Kürzung durch eine Exoprotease sehr wahrscheinlich. Die N-terminal verlängerten SSTI-Varianten lagen bereits vor, um im Vergleich mit rwtSSTI die Markierbarkeit der Glutaminresten zu bestimmen. Sowohl die Tripeptidverlängerung Ala-Gln-Gln als auch die noch längere Variante mit Ala-Pro-Ala-Ala-Gln-Gln besaßen Aminosäuren, die in der nativen Struktur zwischen Signalpeptid und der inhibitorisch aktiven SSTI-Struktur vorkommen. Die Untersuchung der Glutamin-Markierbarkeit erfolgte durch Inkubation der betreffenden rSSTI-Varianten mit Monobiotinylcadaverin (MBC) und MTG und anschließender Visualisierung der MBC-Kopplung über ein Streptavidin-Farbstoffkonjugat (Abbildung 28). Sowohl für den *Sm*-SSTI (wt) (Daten nicht gezeigt) als auch den rSSTI (wt) konnte über eine Inkubationsdauer von 20 h keine TGase-vermittelte Kopplung von MBC festgestellt werden (Abbildung 28). Eine Verlängerung um das Ala-Gln-Gln-Tripeptid (3aa-rSSTI) hingegen führte zu einer Konjugationsrate von 30% nach den ersten 15 min. Die weitere Verlängerung um das Ala-Pro-Ala-Tripeptid erhöhte die Modifikationsgeschwindigkeit auf das Doppelte, und nach 20 h erreichte diese Variante den höchsten Biotinylierungsgrad. Die Ergebnisse der Biotinylierung belegen, dass erst das Vorhandensein der zwei N-terminalen Glutamine den Amineinbau in SSTI durch MTG ermöglicht. Dieser Effekt wird durch das zusätzliche angehängte APA-Tripeptid weiter gesteigert. Die Verlängerung des Peptides erhöht vermutlich die Affinität des N-Terminus zur MTG und dadurch die Markierbarkeit des SSTI. Die Strukturanalyse des inhibitorischen Peptids $\text{DIPIGS}_{\text{Oac}}\text{KMTGNH}_2$, das von der Glutamin-Bindestelle des Papaininhibitors abgeleitet wurde, bestätigte den positiven Effekt hydrophober Aminosäuren (hier: APAAQQ) in der Nachbarschaft von Glutamin auf die Bindestärke von MTG (vgl. Abschnitt 3.4.7).

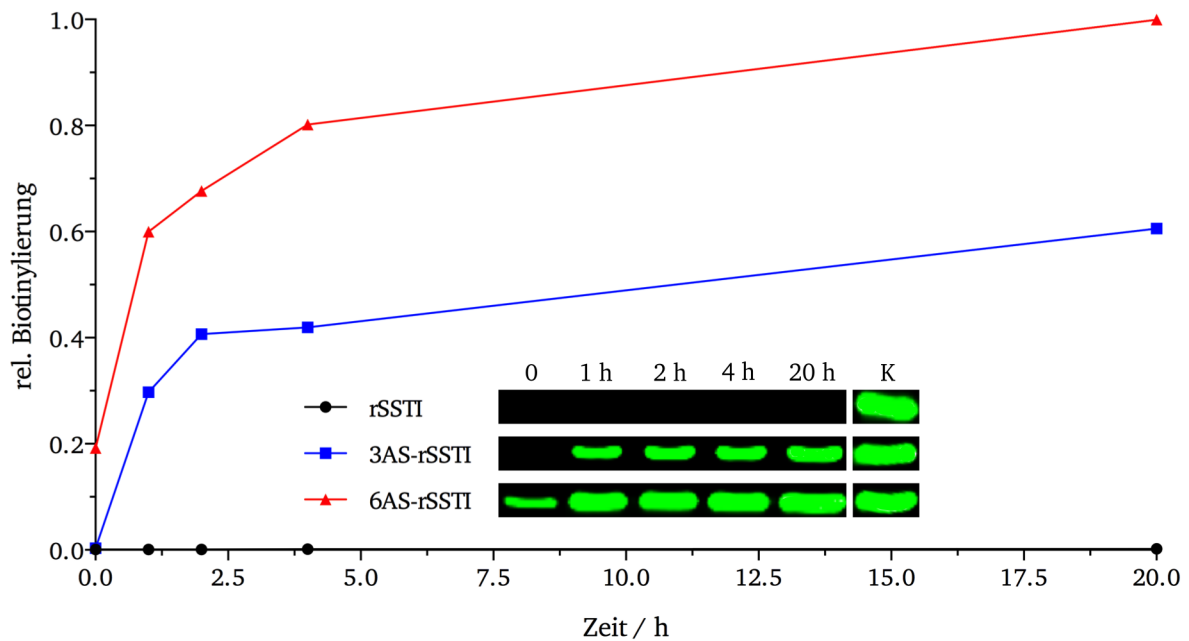


Abbildung 28: Biotinylierung *N*-terminal verlängerter rSSTI-Varianten mit Transglutaminase.

Die Markierung freier Glutamine der rSSTI-Konstrukte (7.5 μ M) erfolgte durch Kopplung mit 100 μ M Monobiotinylcadaverin (MBC) mittels 0.075 μ M MTG in 20 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM NaCl bei 37 °C und 700 rpm. Nach Reaktionsstart durch Zugabe der MTG wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die Proben wurden auf einer 12,5%igen SDS-PAGE analysiert. Die Visualisierung der markierten rSSTI-Varianten erfolgte durch Blotten auf eine PVDF-Membran und Inkubation mit einem Streptavidin-Farbstoffkonjugat. Als 100%-Kontrolle wurde die 20 h Probe des 6aa-rSSTI auf jedem Gel mitgeführt. Sie diente der Berechnung der relativen Biotinylierung.

Ähnlich wie bei der Steuerung der inhibitorischen Aktivität durch *N*-terminale Proteolyse ist eine Steuerung der MTG-vermittelten Vernetzbarkeit sehr wahrscheinlich. In frühen Wachstumsstadien von *S. mobaraensis* in denen noch keine Exopeptidase-Aktivität im Kulturmedium auftritt, kann demnach eine Vernetzung und Verankerung des SSTI erfolgen. Allerdings ist PTP-SM wie die Substratproteine bei einer Submerskultivierung von *S. mobaraensis* bereits vor Aktivierung von MTG in der Kulturbrühe vorhanden [78].

3.4. *Streptomyces* Papain Inhibitor (SPI)

Wie einleitend beschrieben führte die rekombinante Produktion des *Streptomyces*-Papain-Inhibitors (SPI) zu der Annahme, dass das SPI-Protein (SPI_p) ein kofaktorbindendes Protein darstellt, welches eine niedermolekulare Substanz (SPI_{ac}) bindet, die die inhibitorische Aktivität gegenüber Papain vermittelt [30]. Für die Untersuchung der postulierten Interaktion von Protein und Kofaktor erfolgte im ersten Schritt die Reinigung des SPI aus *S. mobaraensis*.

3.4.1. SPI aus *S. mobaraensis*

Die Reinigung des SPI-Holoproteins (SPI_p + SPI_{ac}) erfolgte nach Sarafeddin *et al.* [55] aus 64-h-altem Kulturüberstand von *S. mobaraensis*. Im ersten Schritt wurden hitzelabile Proteine durch

Inkubation bei 70 °C für 30 min mit anschließender Zentrifugation abgetrennt. Es folgte die Präzipitation pH-labiler Proteine durch Ansäuern mit Essigsäure bis zu einem pH von 4.0. Der geklärte Überstand diente anschließend als Auftrag für eine IAC. Ein linearer Salzgradient von 0 – 1 M NaCl eluierte hintereinander die zwei hitzestabilen Proteine SPI und SSTI, die die Hauptbestandteile der noch in Lösung befindlichen Proteine ausmachten (Abbildung 29).

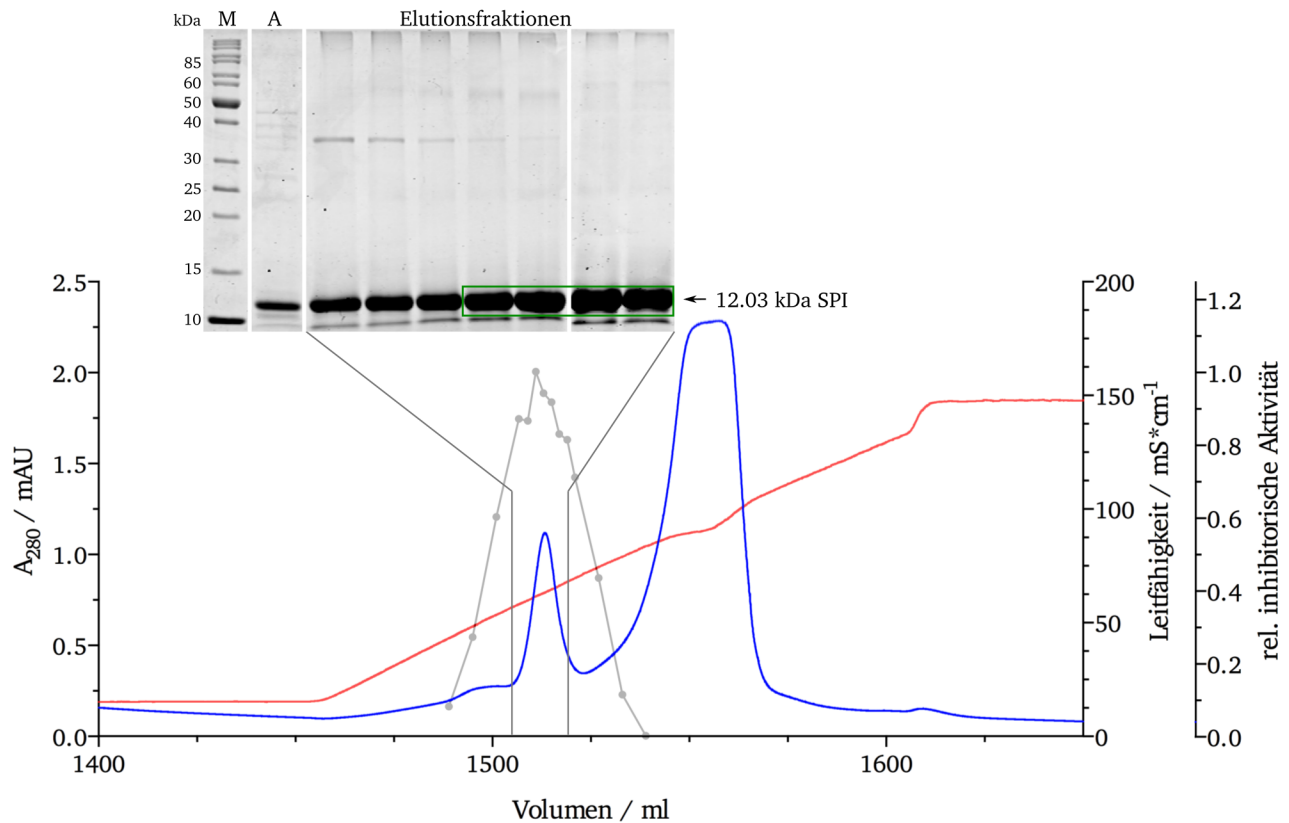


Abbildung 29: Chromatogramm und SDS-PAGE der IAC von *Sm*-SPI.

Zellfreier Kulturüberstand von *S. mobaraensis* (Anzucht 42 °C, 64 h, 110 rpm) wurde hitzebehandelt (70 °C, 30 min) und durch Zugabe von Essigsäure bis zu einem pH von 4.0 angesäuert. Nach Abtrennung präzipitierter Bestandteile erfolgte die Reinigung des SPI über eine 30 ml Fractogel-EMD-SO₃⁻-Säule (Merck) mit 2 ml/min und einem linearen NaCl-Gradienten von 0 – 1 M in 50 mM Na Acetat pH 4.0. Die Gradientenmischung wurde über die steigende Leitfähigkeit (rot) detektiert. Die Protein-Elution wurde bei 280 nm (blau) mit anschließender Analytik durch 12.5%ige SDS-PAGE und Coomassie-Färbung verfolgt. Die Größenzuordnung erfolgte mit einer Molekulargewichtsmarkermischung (M). Die inhibitorische Aktivität Holo-SPI-enthaltender Fraktionen gegenüber Papain (grau) wurde mit Z-Phe-Arg-pNA relativ zu einer Positivkontrolle ermittelt. Vereinigte Fraktionen sind durch einen grünen Kasten gekennzeichnet.

Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegenüber Papain ermöglichte die Zuordnung der Holo-SPI enthaltenen Fraktionen. Fraktionen mit einer rel. inhibitorischen Aktivität ≥ 0.9 wurden vereinigt und für die weitere Reinigung mittels Zentrifugationskonzentratoren auf ca. 1 ml eingengt. Die Aktivitätsbestimmung zeigte zudem, dass der Auftrag und der nicht bindende Durchlauf nahezu identische inhibitorische Aktivität aufwiesen. Je nach Aufarbeitung reduzierte sich die inhibitorische Aktivität des Durchlaufes nur um 1 – 5% bei gleichzeitig vollständiger Abtrennung des SPI_p, daher wurde der Durchlauf für eine möglich Isolierung von SPI_{ac} an anderer Stelle verwendet.

Das Konzentrat der IAC wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min über eine 120 ml Superdex 75 pg *HiLoad* 16/600-Säule (GE Healthcare) chromatographisch gereinigt. Die GPC diente vornehmlich zur Abtrennung restlicher SSTI-Moleküle. Durch die zuvor beschriebene Dimerbildung des SSTI (Abbildung 30) ergab sich eine entsprechend große Molmassendifferenz zum SPI, wodurch die Abtrennung mittels GPC ermöglicht wurde.

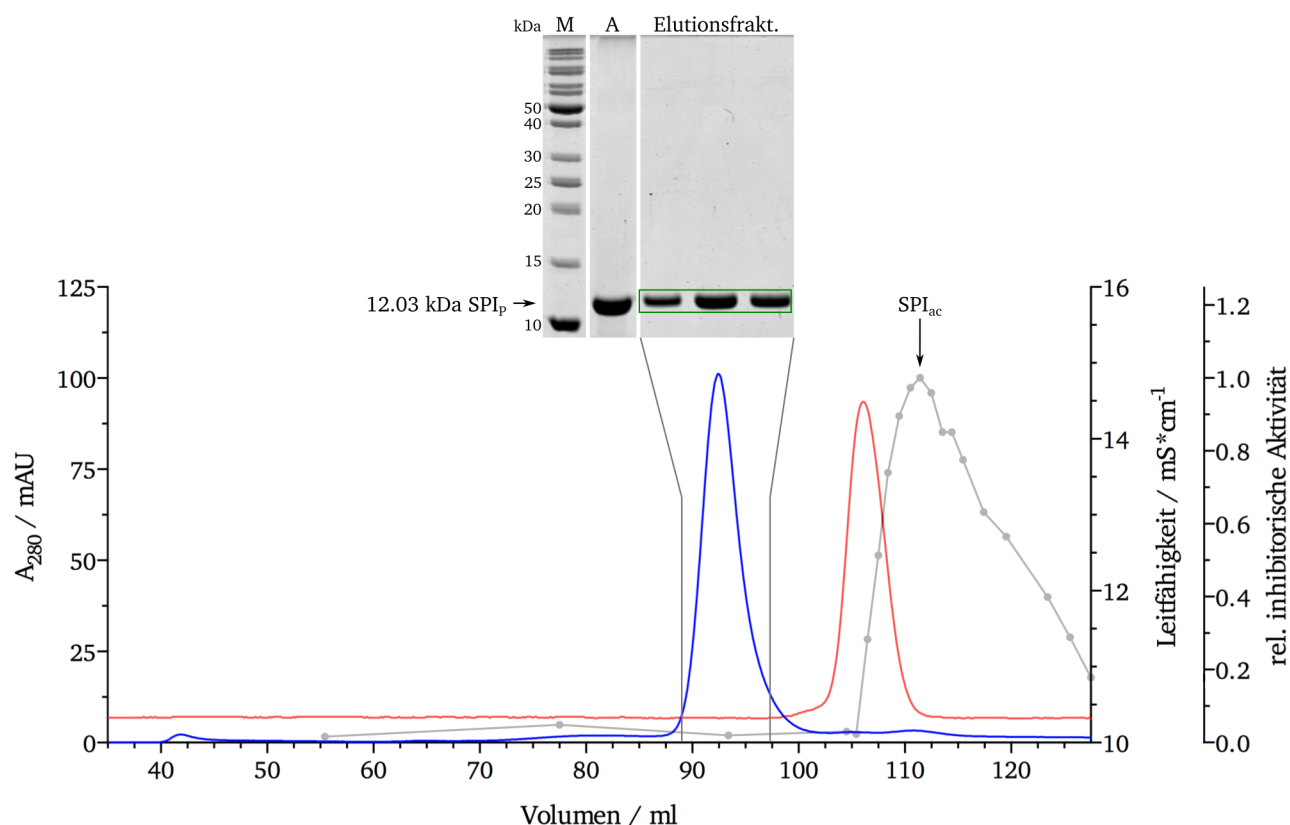


Abbildung 30: Chromatogramm und SDS-PAGE der GPC von 5m-SPI.

Auftrag von 2 mg IAC-gereinigtem SPI auf eine 120 ml Superdex 75 pg *HiLoad* 16/600-Säule (GE Healthcare) bei RT. Die Reinigung erfolgte mit 1 ml/min in 20 mM HEPES NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl. Die Leitfähigkeit ist als rote Linie und die Proteinabsorption bei 280 nm als blaue Linie dargestellt. Die Analytik erfolgte mit 15%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Für die Größenzuordnung wurde eine Molekulargewichtsmarkermischung (M) mitgeführt. Der Auftrag (A) ist gekennzeichnet und vereinigte Fraktionen sind durch einen grünen Kasten markiert. Die inhibitorische Aktivität gegenüber Papain (grau) wurde mit Z-Phe-Arg-pNA relativ zu einer Positivkontrolle ermittelt.

Die Bestimmung der rel. inhibitorischen Aktivität gegenüber Papain zeigte die vollständige Auftrennung des SPI-Holoproteins in SPI_p und SPI_{ac}. SPI_{ac} eluierte deutlich nach dem Salz der injizierten SPI-Probe; daher konnte eine Interaktion des SPI_{ac} mit dem Superdex-Material der GPC-Säule nicht ausgeschlossen werden. Die vergleichende massenspektroskopische Analyse des Holo-SPI und dem aus der GPC hervorgegangen SPI_p offenbarte deutliche Unterschiede in der Beschaffenheit beider Proben (Abbildung 31).

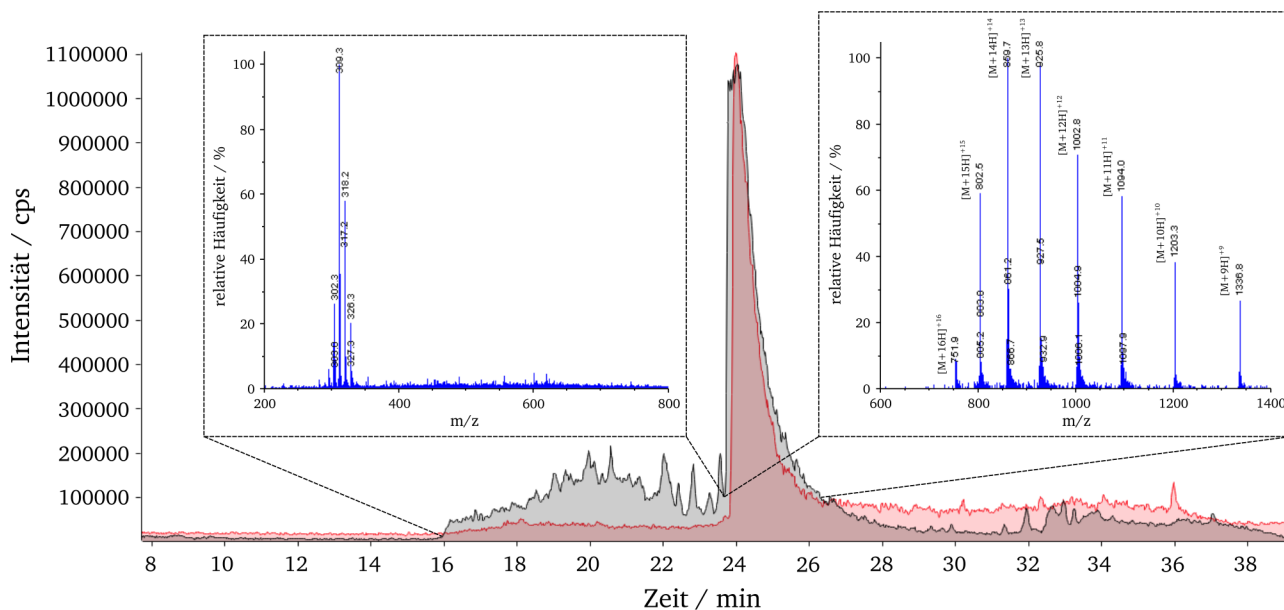


Abbildung 31: Massenspektrometrische Analyse von Sm-SPI nach verschiedenen Reinigungsstufen.

Analytische HPLC-ESI-MS von IAC-gereinigtem Holo-SPI (schwarz) und GPC-gereinigtem Sm-SPI (rot). Die Trennung der Analyten erfolgte bei 0.9 ml/min über eine Nucleodur 300-5 C4ec-Säule (Macherey und Nagel) mit anschließender ESI-MS-Analytik. Dargestellt sind die Intensitäten der Massen in Counts pro Sekunde (cps) über die Zeit. Der linke Einschub zeigt die Aufsummierung der Molekülmassen zwischen 16.0 – 23.8 min und der rechte Kasten die Aufsummierung zwischen 23.8 – 26.0 min mit einem eindeutigen SPI_p-Signal.

Signifikant war das Signalmuster des SPI_p, das zwischen 23.8 min und 26 min die erwarteten Signale eines 9-fach bis 16-fach positiv geladenen Proteins aufweist. Deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung von SPI nach der IAC und der GPC wurden zwischen 16 – 24 min erkennbar. In diesem Bereich eluierten viele Substanzen mit einem m/z zwischen 250 und 700. Es zeigte sich zudem das Signalmuster des von der IAC bei gleicher Salzkonzentration eluierenden unbekannten Proteins (apparente Molmasse von 8 kDa laut SDS-PAGE, Abbildung 29). Sowohl die niedermolekularen Substanzen als auch das unbekannte Protein wurden durch die GPC abgetrennt. Das unbekannte Protein eluierte während der GPC zwischen dem SPI_p und dem Salz der injizierten Puffersubstanzen und wies keine inhibitorische Aktivität auf (Analytik nicht gezeigt). Die Trennung von SPI_p und SPI_{ac} mittels GPC sowie die Beobachtung, dass die inhibitorische Aktivität von Auftrag und Durchlauf der IAC nur marginal divergierten, führten zu dem Schluss, dass eine Reinigung des SPI_{ac} auch ohne das potentielle Apo-Protein möglich ist.

3.4.2. Reinigung von SPI_{ac}

Bei Analyse der initialen IAC des Sm-SPI (Abbildung 29) wurde deutlich, dass das Maximum der Absorption bei 280 nm, welches die Elution der Proteine detektiert, eine leichte Verschiebung im Vergleich zum Maximum der inhibitorischen Aktivität aufweist. Der SPI_p eluierte ca. 5 ml später von der IAC-Säule als die inhibitorische Komponente. Aufgrund dieser Beobachtung erfolgte die

Optimierung der IAC im 3 ml-Maßstab und die Rechromatographie der vereinigten IAC-Fractionen des *Sm*-SPI Holoproteins (Abbildung 32).

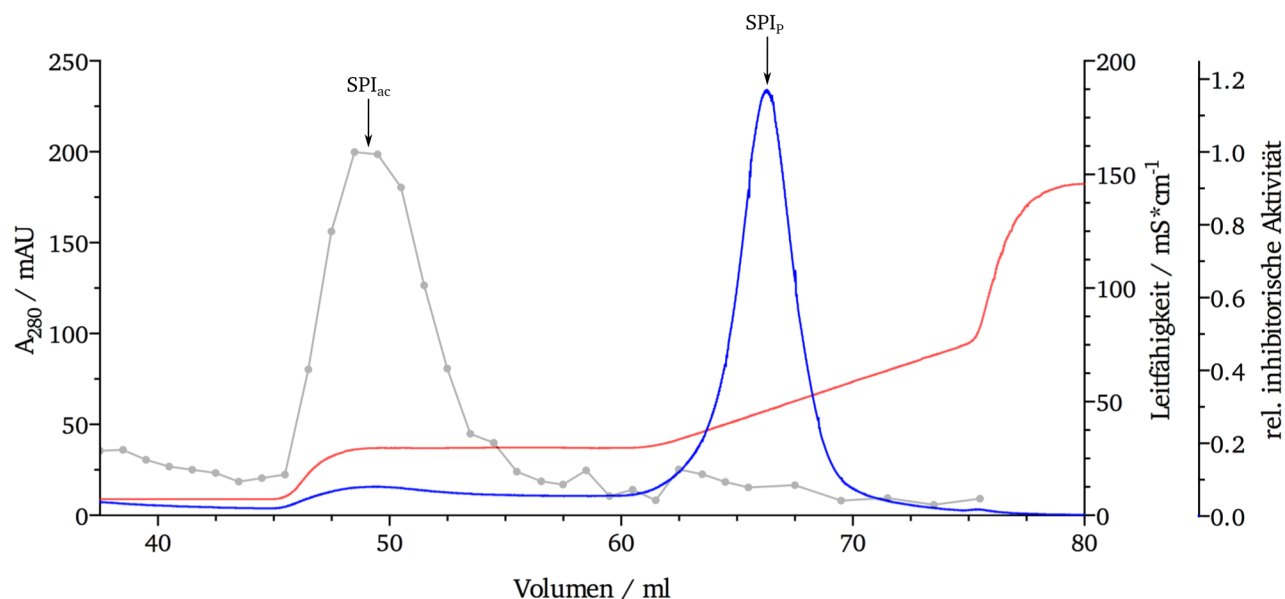


Abbildung 32: Basislinientrennung von *Sm*-SPI_p und SPI_{ac} mittels IAC.

Für die analytische Trennung der inhibitorischen und proteinösen Komponente des *Sm*-SPI über die positiven Ladungen der Moleküle erfolgte die Beladung einer 3 ml Fractogel-EMD-SO₃⁻-Säule (Merck) mit 4 mg IAC-gereinigtem *Sm*-SPI. Die Elution erfolgte mit 1 ml/min bei steigender Salzkonzentration durch einen Stufengradienten mit 150 mM NaCl, gefolgt von einem linearen Gradienten bis 500 mM NaCl. Die Gradientenmischung wurde über die steigende Leitfähigkeit (rote Linie) und die Elution des Proteins anhand der Absorption bei 280 nm (blau) detektiert. Die inhibitorische Aktivität der gesammelten Fraktionen gegenüber Papain (grau) wurde mit Z-Phe-Arg-pNA relativ zu einer Positivkontrolle ermittelt.

Es stellte sich heraus, dass nach Auftrag von 4 mg Holo-SPI auf eine 3 ml IAC-Säule (Fractogel EMD SO₃⁻, Merck) anschließendes Spülen der Säule mit 150 mM NaCl in 50 mM Na Acetat pH 4.0 zur Elution der inhibitorischen Komponente des Holo-SPI ausreichte. Das Protein eluierte im Anschluss Basislinien-getrennt zwischen 150 mM und 500 mM NaCl. Damit konnte gezeigt werden, dass die Bindung an das negativ geladene Säulenmaterial nicht nur auf einer Bindung an den SPI_p, sondern auf einer positiven Eigenladung des SPI_{ac} beruht. Um die weitere Reinigungsstrategie für den SPI_{ac} festzulegen, wurden Säulenmaterialien mit unterschiedlichen Eigenschaften auf ihre Eignung, SPI_{ac} bei unterschiedlichen pH-Werten zu binden, untersucht (Tabelle 14).

Tabelle 14: SPI_{ac}-Bindekapazität verschiedener Säulenmaterialien.

Material- beschreibung	funktionelle Gruppe	Material- bezeichnung	pH ²					rel. inhibitorische Aktivität des Überstandes / % ¹
			2	5	7	9	12	
starker Kationen- austauscher	Sulfonat	Amberlite IR-120	18.7	27.8	46.8	53.9	67.2	
		Fractogel EMD SO ₃ ⁻	22.7	31.9	44.9	47.7	65.3	
schwacher Kationen- austauscher	Carboxymethyl	Amberlite CG-50	26.3	32.5	44.2	91.3	70.7	
starker Anionen- austauscher	Trimethylammonium- ethyl	Fractogel EMD TMAE	51.9	43.4	51.2	51.1	61.1	
schwacher Anionen- austauscher	Diethylamino ethyl	Sepharose DEAE	56.7	48.8	52.9	56.4	57.5	
		Sephardex DEAE	66.4	55.7	52.7	67.8	70.3	
	Tertiäres Amin	Amberlite IRA-67	65.8	55.1	52.3	59.8	82.2	
HIC- Material	hydrophober Polyaromat	Amberlite XAD-16	17.4	14.6	12.9	30.3	19.7	
	Butyl	Sepharose Butyl	59.8	50.9	55.4	58.7	67.1	
	Phenyl	Toyopearl Phenyl 650 M	49.2	47.1	47.7	51.7	57.9	
Reversed- Phase-Material	C ₁₈ -Alkyl	M+N Polygoprep 60-50 C ₁₈	17.2	14.9	13.1	31.2	19.2	

¹ 500 µl des jeweiligen Säulenmaterial wurde mit 800 µl SPI_{ac}-haltigem IAC-Extrakt aus erhitzter Kulturbrühe für 1 h bei RT und 200 rpm inkubiert. Angegeben ist die rel. inhibitorische Aktivität der Überstände gegenüber Papain. Eine starke Bindung von SPI_{ac} an das Material (niedrige inhibitorische Aktivität im Überstand) ist grün, eine schwache Bindung (hohe inhibitorische Aktivität im Überstand) rot und eine mittlere Bindekapazität weiß unterlegt. ² Als Puffer dienten 20 mM KCl HCl pH 2.0, 20 mM Na Acetat pH 5.0, 20 mM K₂HPO₄ pH 7.0, 20 mM Tris HCl pH 9.0 und 20 mM KCl-NaOH pH 12.0.

Die stärkste Bindung erfolgte an ein C₁₈-Material (Polygoprep 60-50 C₁₈, Macherey und Nagel) sowie an ein Material mit hydrophoben Polyaromaten als funktionelle Gruppe (Amberlite XAD-16, Sigma Aldrich) über den gesamten pH-Bereich. An Anionenaustauscher erfolgte wie erwartet keine signifikante Bindung über den gesamten getesteten pH-Bereich. Die beste pH-abhängige Bindung zeigten Kationenaustauschmaterialien bei niedrigen pH-Werten im Bereich von 2.0 – 5.0. Die Verschiebung des pH-Wertes in den neutralen bzw. basischen Bereich reduzierte die Bindung an diese Materialien drastisch. Diese Beobachtung verstärkte die Vermutung, dass SPI_{ac} bei niedrigem pH eine positive Ladung trägt und, ein peptidisches Grundgerüst unterstellt, mindestens eine basische Aminosäure aufweist. Des Weiteren legten die Versuche ausgeprägte hydrophobe Bereiche des Moleküls nahe, die eine Bindung an hydrophobe Polyaromaten oder C₁₈-Materialien ermöglichten.

Davon ausgehend wurde Amberlite XAD-16 für die initiale Bindung und Extraktion des SPI_{ac} aus vorgereinigtem Kulturüberstand (nach IAC-Durchlauf) in Betracht gezogen. Da der Amberlite XAD-16-Hersteller für die Reinigung kleiner peptidischer Verbindungen Amberlite XAD-4 empfiehlt und XAD-16 hingegen für mittlere Molmassenbereiche bis hin zu Proteinen geeignet ist, erfolgten vergleichende Bindungs- und Elutionsexperimente beider Materialien. XAD-4 und -16 unterscheiden sich laut Herstellerangaben nur durch die Größe ihrer Partikeloberfläche und Porengröße. Die funktionelle Gruppe ist bei beiden Materialien hingegen identisch. Die Bindung des SPI_{ac} erfolgte aus vorgereinigtem

Kulturüberstand bei pH 4.0. Nach mehrfachem Waschen mit Wasser wurden für die Elution unterschiedliche Methanol-Wasser-Gemische getestet. Die Vorversuche (Ergebnisse nicht gezeigt) ergaben eine deutlich stärkere Bindung des SPI_{ac} an XAD-4. Bei XAD-16 erfolgte eine signifikante Elution der inhibitorischen Substanz bereits bei 40%, bei XAD-4 hingegen erst ab 60% Methanol. Die vollständige Elution des SPI_{ac} wurde bei beiden Materialien mit reinem Methanol erreicht. Die stärkere Bindung an XAD-4 ermöglichte die Durchführung eines Waschschrilles mit 20% Methanol und damit die Entfernung schwach hydrophob-bindender Verunreinigungen. Das XAD-4-Methanol-Eluat wurde anschließend am Rotationsverdampfer konzentriert, wobei durch Zugabe von Wasser in regelmäßigen Abständen ein vollständiges Eindampfen vermieden wurde. Vollständige Trocknung ergab ein bräunliches Harz, das kaum in Lösung zu bringen war und nur noch eine sehr geringe inhibitorische Aktivität aufwies. Aus dem gleichen Grund wurde das Extrakt in Wasser gelagert und zügig weiterverarbeitet.

Der folgende Reinigungsschritt mit Amberlite IR-120 (Sigma Aldrich) nutzte die positive Ladung des Moleküls im Säuren zur Bindung an Sulfonatgruppen und Elution im Basischen. Im Vergleich zum Fractogel-EMD-SO₃⁻-Material (Merck) weist Amberlite IR-120 eine deutlich höhere Bindekapazität für niedermolekulare Substanzen auf. Dies wird vermutlich durch eine höhere Dichte an funktionellen Gruppen erreicht, da Amberlite IR-120 vom Hersteller für die Bindung niedermolekulare Substanzen und Fractogel EMD SO₃⁻ für Proteine optimiert wurde. Die Bindung des SPI_{ac} an eine 206 ml Amberlite-IR-120-Säule erfolgte bei pH 4.0 mit einer Flussrate von 5 ml/min mit anschließender chromatographischer Trennung (Abbildung 33). Nach erfolgreicher Bindung an das Säulenmaterial erfolgte ein Waschschrill unter Hochsalzbedingungen mit 20 mM Acetat pH 4.0 und 3 M NaCl. Die hohe Salzkonzentration führte nur geringfügig zur Elution inhibitorisch aktiver Substanzen, jedoch ließen sich schwach ionisch gebundene Verunreinigungen entfernen. Nach Spülen der Säule mit 20 mM Acetat pH 4.0 wurden hydrophob gebundene Substanzen mit einem Gemisch aus Methanol und 20 mM Acetat pH 4.0 (70:30, v/v) abgetrennt. Die Elution des SPI_{ac} erfolgte durch Anheben des pH auf 12.0. Fraktionen mit hoher inhibitorischer Aktivität gegenüber Papain wurden vereinigt. Der basische pH der vereinigten Fraktionen wurde neutralisiert, und der SPI_{ac} erneut über seine hydrophoben Eigenschaften mit XAD-4 extrahiert. Das wie zuvor konzentrierte Wasserextrakt wurde lyophilisiert, dessen Rückstand konnte über mehrere Monate ohne Verlust von inhibitorischer Aktivität bei 4 °C gelagert werden.

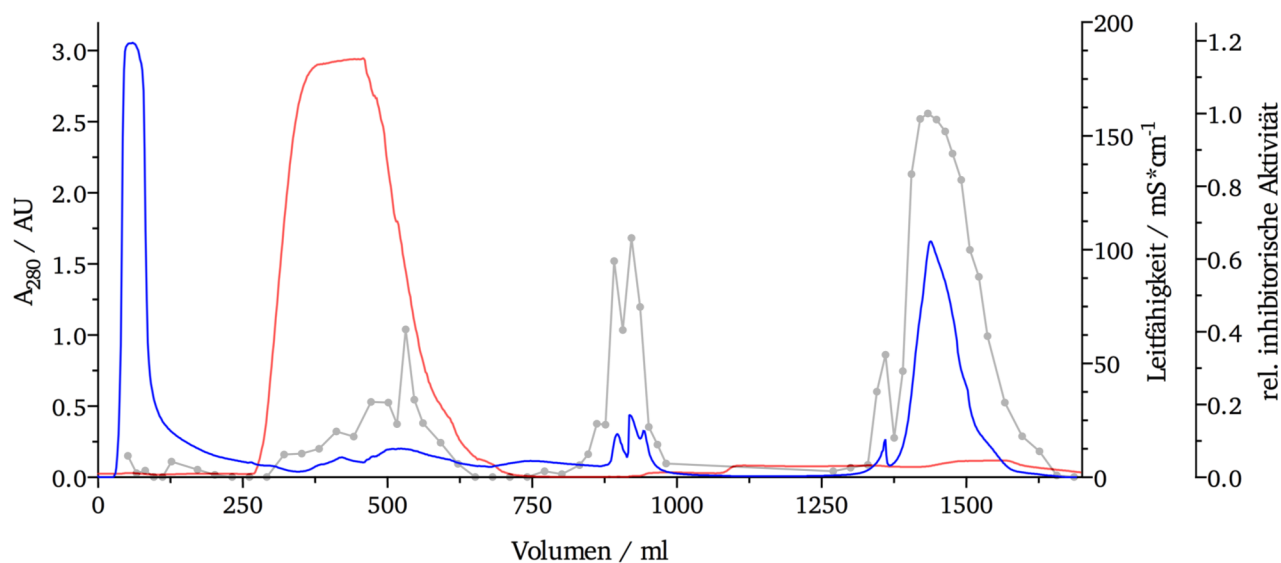


Abbildung 33: Chromatogramm der IAC von SPI_{ac}.

Auftrag von 25 ml XAD-4-SPI_{ac}-Extrakt (angesäuert mit Essigsäure auf pH 4.0) auf eine 206 ml Amberlite-IR-120-Säule (Sigma Aldrich) mit 5 ml/min bei RT. Nach Auftrag wurden ungebundene Substanzen mit 20 mM Na Acetat pH 4.0 von der Säule gewaschen. Ionisch gebundene Verunreinigungen wurden anschließend mit 20 mM Na Acetat pH 4.0, 3 M NaCl und hydrophobe Verunreinigungen mit einem Gemisch aus Methanol und 20 mM Na Acetat pH 4.0 (70:30, v/v) abgetrennt. Die Elution erfolgte durch pH-Anhebung mit 500 ml 20 mM KCl pH 12.0 bei 0.5 ml/min. Die Leitfähigkeit ist als rote Linie und die Absorption bei 280 nm als blaue Linie dargestellt. Die inhibitorische Aktivität der gesammelten Fraktionen gegenüber Papain (grau) wurde mit Z-Phe-Arg-pNA relativ zu einer Positivkontrolle ermittelt.

Versuche, das IAC-Extrakt mittels Umkehrphasen-Chromatographie zu reinigen, schlugen bei diesem Reinheitsgrad fehl, da selbst im analytischen Maßstab keine Basislinientrennung der enthaltenen Substanzen erzielt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da das IAC-Extrakt eine sehr gute Löslichkeit in Methanol aufwies, wurde auf eine Standard-Reinigungsmethode der organisch-präparativen Chemie, der Säulenchromatographie mit Kieselgel-60, zurückgegriffen. Bei diesem Verfahren beruht die Trennung auf der unterschiedlich starken Adsorption der in Lösung befindlichen Substanzen an das stationäre Kieselgel-60 (Macherey und Nagel). Je nach Stärke der Adsorption an das Säulenmaterial erfolgt die Elution der Substanzen zeitversetzt. Schwach adsorbierende Substanzen eluieren dementsprechend sehr früh, wohingegen stark adsorbierende Substanzen gar nicht bzw. sehr langsam eluieren. Dadurch können auch Substanzen mit sehr ähnlichen chemischen Eigenschaften voneinander getrennt werden. Nach Vorversuchen mittels Dünnschichtchromatographie war ein 70:30-(v/v)-Gemisch aus Methanol/Dichlormethan für die Trennung des IAC-Extrakts geeignet (nicht gezeigt). Die Trennung von 200 mg Feststoff in 4 ml Methanol erfolgte über eine in Laufmittel flüssig gepackte Kieselgel-60-Säule mit einem Bettvolumen von ca. 440 ml ohne Überdruck. Die inhibitorisch-aktiven Substanzen eluierten nach Zugabe von 400 - 1500 ml Laufmittel (Abbildung 34).

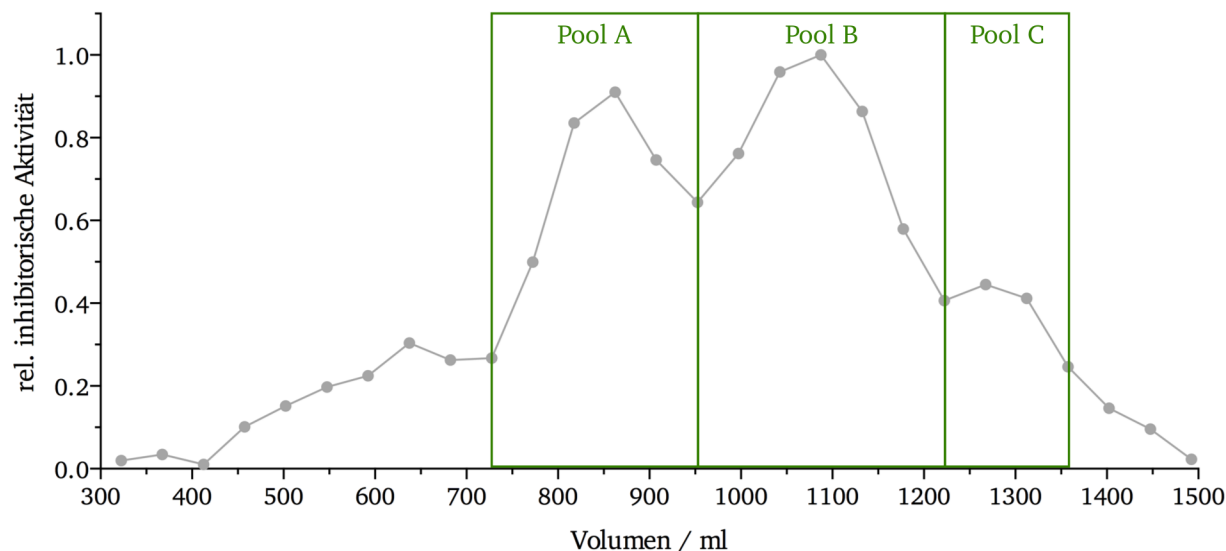


Abbildung 34: Trennung von SPI_{ac} durch Kieselgel-60-Chromatographie.

Auf eine 440 ml Kieselgel-60-Säule wurden ca. 200 mg in 4 ml Methanol gelöstem SPI_{ac}-Lyophilisat nach IR-120-Reinigung aufgegeben und mit Methanol-Dichlormethan im Verhältnis 70:30 als mobile Phase getrennt. Die inhibitorische Aktivität der gesammelten Fraktionen (je ca. 15 ml) gegenüber Papain (graue Linie) wurde mit Z-Phe-Arg-p/NA relativ zu einer Positivkontrolle ermittelt. Vereinigte Fraktionen sind mit einem grünen Kasten gekennzeichnet.

Insgesamt ergaben sich anhand der inhibitorischen Aktivität drei Hauptpeaks. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und wie zuvor unter Zugabe von Wasser konzentriert.

Nach Ansäuern der Proben mit 0.1% TFA und Abtrennung präzipitierender Substanzen mittels Zentrifugation und Filtration erfolgte die chromatographische Reinigung über eine präparative Umkehrphasen-Chromatographie. Der verwendete Gradient wurde in Vorversuchen auf einer analytischen C₁₈-Säule für den Pool C ermittelt (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Vergleich der chromatographischen Trennung über eine präparative C₁₈-Säule (Vario Prep VP 250/21 NUCLEOSIL 300-5 C18, Macherey-Nagel) der drei unterschiedlichen Kieselgel-Extrakte verdeutlicht die unterschiedliche Zusammensetzung der Proben und die Vielzahl der enthaltenen Substanzen (Abbildung 35A). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegenüber Papain ermöglichte die Identifikation der inhibitorisch aktiven Substanzen. Exemplarisch ist die Trennung des Kieselgel-Extrakts *Pool C* (vergl. Abbildung 34) über die präparative HPLC gezeigt (Abbildung 35B). Die Vereinigung der aktiven Fraktionen erfolgte in Übereinstimmung mit ihrer Absorption bei 220 nm.

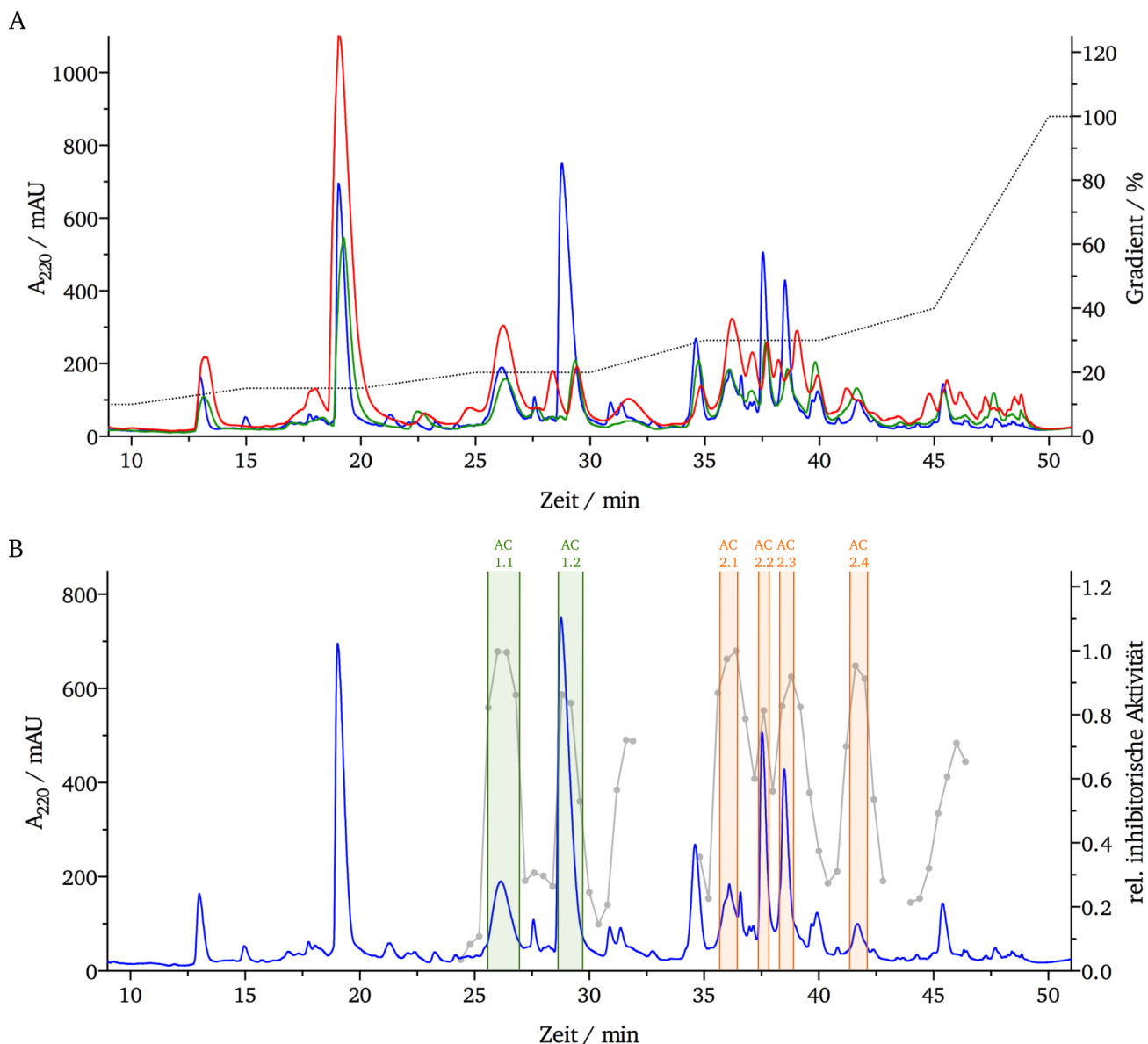


Abbildung 35: Präparative C_{18} -HPLC von SPI_{ac} nach Kieselgel-60-Chromatographie.

Die HPLC erfolgte mit einem Fluss von 25 ml/min über präparative C_{18} -Säule (VarioPrep VP 250/21 NUCLEOSIL 300-5 C_{18} , Macherey und Nagel). Als mobile Phasen dienten Wasser und Acetonitril mit je 0.1% TFA. Die Elution erfolgte mit steigenden Acetonitrilanteil. A) Präparativer HPLC-Vergleich verschiedener SPI_{ac} -Pools nach Kieselgelchromatographie (vergl. Abbildung 34). Die bei A_{220} absorbierenden Substanzen sind für Pool A in grün, für Pool B in rot und für Pool C in blau dargestellt. Die vereinigten Fraktionen der Kieselgel-Reinigung wurden auf ein Volumen < 0.5 ml eingengt und 1:2 mit Eluent A verdünnt. Anschließend erfolgte der Auftrag von 900 μ l auf die Säule. Das theoretische Gradienten-Mischungsverhältnis ist als gepunktete Linie dargestellt. B) Chromatogramm der präparative HPLC von Pool C. Eluatfraktionen wurden auf inhibitorische Aktivität gegenüber Papain mit Z-Phe-Arg-pNA überprüft (graue Kurve) und, wie gezeigt, vereinigt (Pools AC1.1 - AC2.4).

Nach Abtrennung des Acetonitrils erfolgte die Gefriertrocknung der vereinigten Fraktionen und die weitere Analytik mittels HPLC, Massenspektrometrie und NMR.

Die analytische HPLC der gereinigten Substanzen mit anschließender ESI-MS identifizierte AC1.1, AC1.2, AC2.3 und AC2.4 als einheitliche Substanzen, wobei AC1.1 und AC1.2 sowie AC2.3 und AC2.4 trotz unterschiedlicher Retentionszeiten identische MS-Muster aufwiesen. Die restlichen Isolate stellten Stoffgemische dar, die sich nicht für die Strukturaufklärung und Charakterisierung eigneten.

Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten zudem, dass es sich bei AC2.1 und AC2.2 um Stoffgemische der in AC1.1 und AC2.3 detektierten Substanzen handelte (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Substanzen AC1.1, AC1.2 und AC2.3 wurden für die weitere Strukturaufklärung und Charakterisierung des SPI_{ac} eingesetzt. Die Präparation von AC2.4 führte nur zu so geringen Ausbeuten, dass eine vollständige Analyse nicht möglich war.

3.4.3. Strukturaufklärung und biochemische Charakterisierung des SPI_{ac}

Für die Reinsubstanz AC1.1 wurde durch ESI-MS-Analytik eine Masse von 625.3 ermittelt. Dabei konnte das einfach geladene Molekül mit m/z von 626.3 $[M+H]^+$ sowie ein doppelt geladenes Molekül mit 313.7 $[M+2H]^{2+}$ detektiert werden. Ein weiterer Peak wies ein m/z von 644.3 $[M+H_2O+H]^+$ auf und zeigte, dass die Substanz ein Wassermolekül binden kann. Die Analytik ergab für AC2.3 eine sehr ähnliche Masseverteilung, jedoch mit einer Masse von 609.3. Auch bei AC2 tritt die Masse einfach (610.3 $[M+H]^+$) sowie zweifach (305.7 $[M+2H]^{2+}$) geladen auf und zeigte ebenfalls die Bindung eines Wassermoleküls (628.3 $[M+H_2O+H]^+$). Der Massenunterschied zwischen AC1 und AC2 beträgt ein m/z von 16 und weist auf eine Hydroxylgruppe hin, die AC2 fehlt (Abbildung 36). Auffällig ist, dass sich sowohl AC1 als auch AC2 während der präparativen C₁₈-HPLC in mehrere Peaks mit identischem MS-Muster auftrennen. Dieses Laufverhalten legt nahe, dass beide Substanzen in unterschiedlichen Konformationen vorkommen.

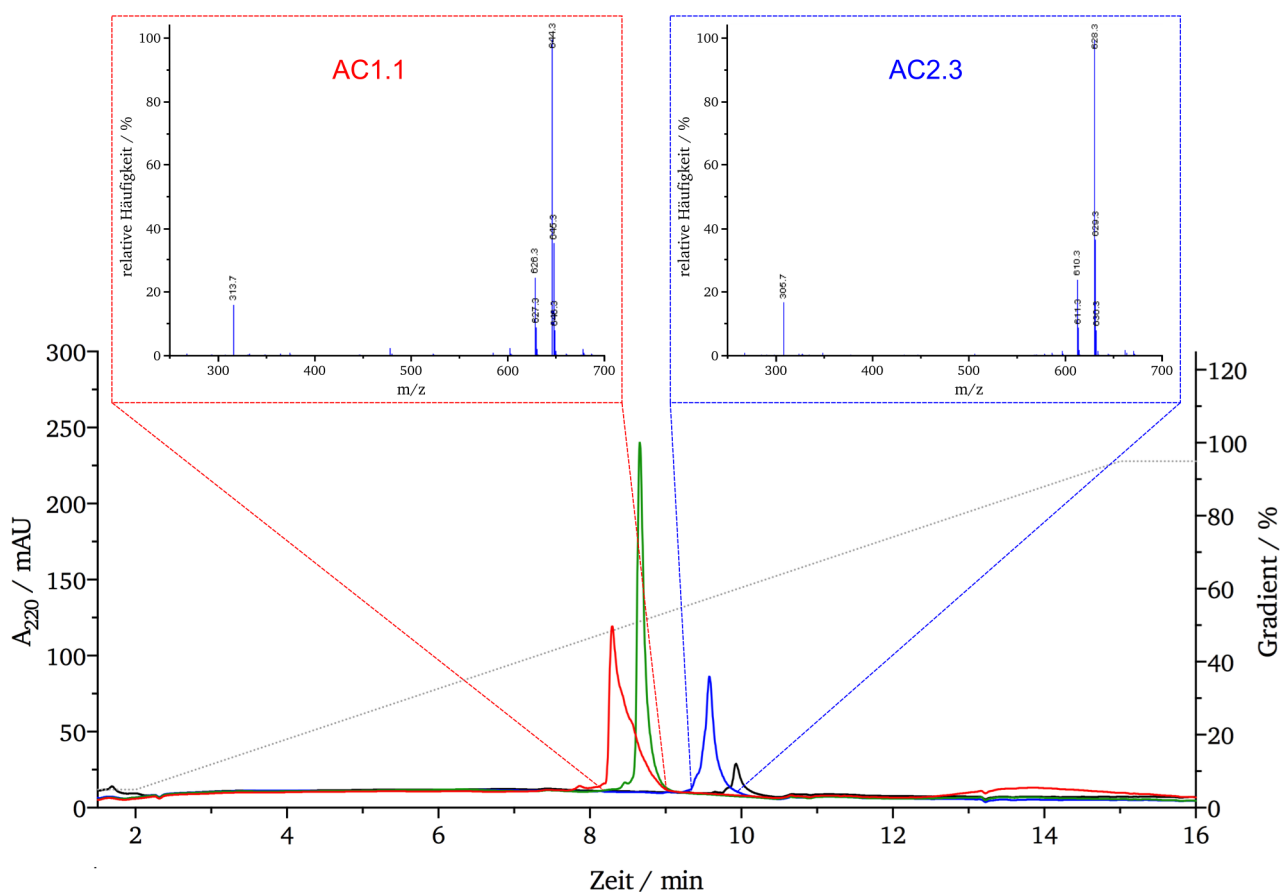


Abbildung 36: Massenspektrometrische Analyse der SPI_{ac}-Isolate nach präp. HPLC.

Gezeigt ist die Absorption bei 220 nm der analytischen HPLC lyophilisierter SPI_{ac}-Isolate nach präp. HPLC. Geringe Mengen AC1.1 (rot), AC1.2 (grün), AC2.3 (blau) und AC2.4 (schwarz) wurden in Wasser mit 0.1% Ameisensäure gelöst und analysiert. Die Trennung der Analyten erfolgte bei 0.3 ml/min über eine Sunfire C18 (100 x 2.1 mm, Waters)-Säule mit anschließender ESI-MS-Analytik im Positivmodus. Die Elution erfolgte mit linear zunehmendem Anteil an Acetonitril in 0.1% Ameisensäure. Der linke rot gerahmte Einschub zeigt die Aufsummierung der Massen zwischen 8.2 – 9.0 min von AC1.1, der rechte blau gerahmte Einschub die Aufsummierung von AC2.3 im Bereich von 9.4 – 9.9 min. Die Substanzen AC1.1 und AC1.2 sowie AC2.3 und AC2.4 zeigten die identischen Massen, weshalb auf die Darstellung von AC1.2 und AC2.4 verzichtet wurde.

Ausgehend von Literaturdaten und den experimentell ermittelten Eigenschaften der isolierten Substanzen wurde für SPI_{ac} ein struktureller Aufbau vergleichbar mit Antipain und Antipain Y postuliert. Antipain wurde erstmals durch Suda *et al.* 1972 beschrieben [139], die Antipain aus *Streptomyces michigaensis* und *Streptomyces yokosukanensis* isolierten. Umezawa *et al.* gelang die strukturelle Aufklärung von Antipain (Abbildung 37) und seines Wirkmechanismus [140]. Das Grundgerüst besteht aus vier Aminosäuren mit einer terminalen Aldehydfunktion, über die bei der Inhibierung des Papains ein stabiles Thiohalbacetal mit dem im aktiven Zentrum befindlichen Cystein gebildet wird (Abbildung 37A). Damit gehört Antipain zu der sehr potenten Inhibitorklasse der Aldehyde mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich [141]. Die Affinität des Inhibitors zur Protease wird durch strukturelle Ähnlichkeit des Tetrapeptidrückgrats zum nativen Substrat der Protease erreicht. Ausgehend von Antipain wurden in den vergangenen Jahren unterschiedliche Antipain-Derivate identifiziert und isoliert. Beispielsweise besitzt Antipain Y ein Tyr an Stelle des Phe4 von Antipain

[142]. Bei einem weiteren Derivat, FA-70C1, liegen hingegen Modifikationen der enthaltenen Arginine vor. Arg3 wurde durch Citrullin ersetzt und das terminale Arg1 liegt zyklisiert vor (Abbildung 37B) [143].

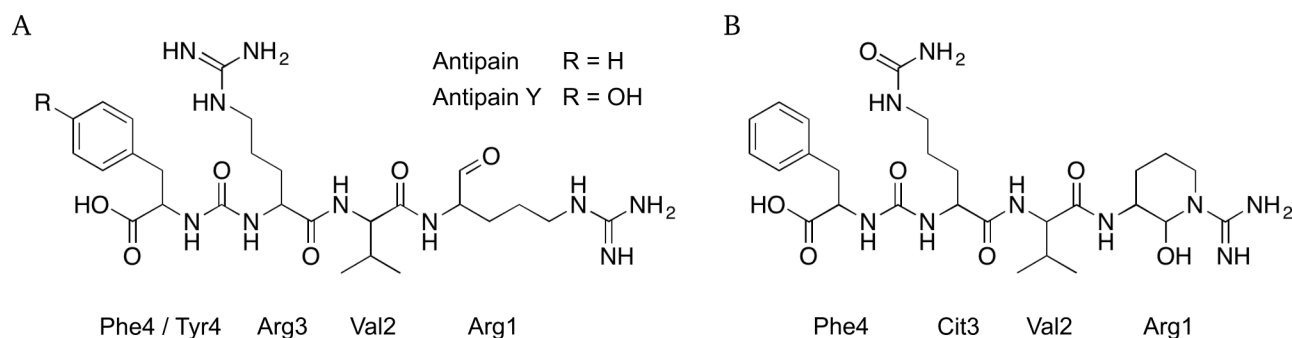


Abbildung 37: Strukturen von Antipain-Derivaten als Muster zur Bestimmung der SPI_{ac}-Struktur.

A) Antipain und Antipain Y [142] sowie B) FA-70C1 [143].

Die unterschiedlichen Varianten des Antipains verdeutlichen die Diversität bakterieller, peptidischer Inhibitoren. Mit einer molaren Masse von 604.71 g/mol für Antipain, 605.69 g/mol für FA-70C1 und 621.71 g/mol für Antipain Y haben alle drei Antipain-Derivate eine ähnliche Masse wie die SPI_{ac}-Isolate. Die beobachteten Eigenschaften des SPI_{ac}, die durch eine positive Ladung unter sauren Bedingungen, hydrophobe Wechselwirkungen mit entsprechend hydrophoben Säulenmaterialien und eine starke Inhibierung von Papain und anderen Cysteinproteasen wie Gingipain gekennzeichnet sind, führten zu der Annahme, dass Antipain eine Leitstruktur für die Ermittlung der SPI_{ac}-Struktur durch beispielsweise NMR-Spektrometrie sein könnte. Ausgehend von einem Tetrapeptid mit mindestens einer basischen Aminosäure (positive Ladung), mindestens einer hydrophoben Aminosäure, einer Aldehyd-Funktion sowie einer Carbamid-Bindung (-NH-C(O)-NH-) zwischen zwei Aminosäuren und unter der Annahme, dass die natürlichen Aminosäuren die Inhibitorbausteine sind, waren nur wenige Strukturen möglich. Für AC1 ergab sich als wahrscheinlichste Zusammensetzung ein Molekül aus den Aminosäuren Tyr₂, Arg und Val sowie für AC2 Tyr, Phe, Arg und Val. Die Reihenfolge der Aminosäurezusammensetzung war jedoch unbekannt und konnte erst *via* NMR-Analytik an der TU Darmstadt durch Prof. Meusinger geklärt werden. Dabei ergaben sich die in Abbildung 38 dargestellten Strukturen für AC1.1/AC1.2 und AC2.3. Die Messdaten der NMR sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Substanzen AC1.1 und AC1.2 zeigten nahezu identische ¹H-NMR und ¹³C-NMR Spektren und wurden aus Mangel an Substanz für die Erstellung eines ¹⁵N-NMR-Spektrums vereinigt. Beide Substanzen stellen Konformationsisomere derselben Substanz dar, was eine Erklärung für das beobachtete Laufverhalten auf der analytischen sowie präparativen HPLC darstellt.

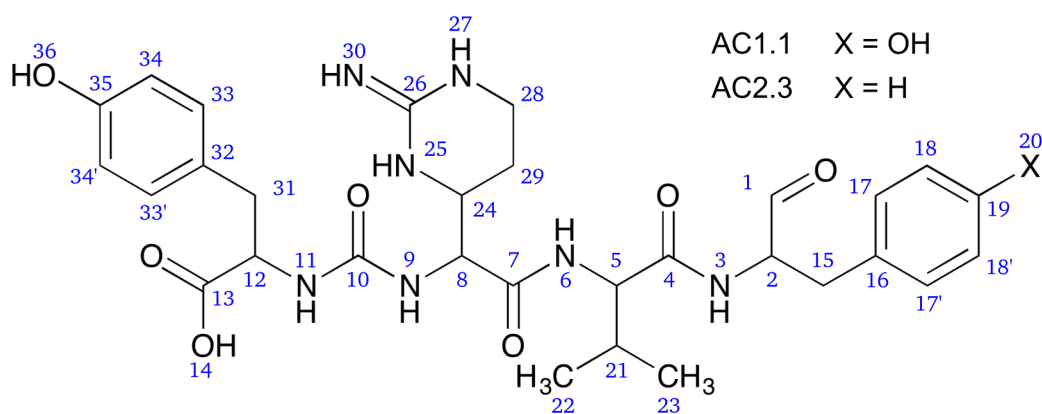


Abbildung 38: Struktur von AC1.1 und AC2.3.

Tabelle 15: NMR-Daten AC1.1 und AC2.3.

Position	chemische Verschiebung δ (ppm)				
	$^1\text{H-NMR}^a$		$^{13}\text{C-NMR}^a$		$^{15}\text{N-NMR}^b$
	AC1.1	AC2.3	AC1.1	AC2.3	AC1.1
1	9.44 (s)	9.51 (s)	200.1	200.1	-
2	4.3 (m)	4.4 (ddd; 10.3; 7.6; 4.3)	60.0	59.8	-
3	8.48 (d; 7.0)	8.54 (d; 7.6)	-	-	-265.2
4	-	-	171.5	171.5	-
5	4.23 (dd; 8.4; 5.8)	4.21 (dd; 8.3; 6.2)	57.7	57.9	-
6	8.07 (d; 8.3)	8.03 (d; 8.2)	-	-	-263.4
7	-	-	169.5	169.6	-
8	4.50 (dd; 6.9; 8.5)	4.50 (dd; 8.5; 6.8)	54.3	54.4	-
9	6.71 (d; 8.6)	6.72 (d; 8.4)	-	-	-300.0
10	-	-	157.2	157.1	-
11	6.43 (d; 7.9)	6.42 (d; 7.9)	-	-	-294.0
12	4.26 (m)	4.24 (dt; 7.6; 6.3)	54.2	57.8	-
13	-	-	173.4	173.5	-
14	12.6 (br)	12.6 (br)	-	-	-
15	3.03 (dd; 5.0; 14.3) 2.71 (dd; 9.1; 14.3)	3.16 (dd; 14.1; 4.2) 2.73 (dd; 14.1; 10.8)	32.6	33.2	-
16	-	-	127.0	137.3	-
17, 17'	7.01 (d; 8.5) ¹	7.23 (m)	130.0	129.0	-
18, 18'	6.65 (d; 8.4) ²	7.26 (m)	114.9	128.0	-
19	-	7.20 (m)	155.8	126.0	-
20	9.2 (b)	-	-	-	-
21	1.99 (o; 6.5)	1.88 (o; 6.6)	30.3	30.8	-
22	0.84 (d; 6.9)	0.73 (d; 6.8)	19.4	17.5	-
23	0.86 (d; 6.8)	0.66 (d; 6.8)	19.2	17.1	-
24	3.51 (m)	3.54 (m)	50.8	51.1	-
25	7.42 (br) ³	7.46 (br) ⁴	-	-	-297,0
26	-	-	153.7	151.0	-
27	7.86 (br) ³	7.88 (br) ⁴	-	-	-302,0
28	3.13 (m) 3.29 (m)	3.15 (m; br) 3.30 (m; br)	35.9	36.3	-
29	1.62 (m, br)	1.61 (m) 1.68 (m)	20.4	20.5	-
30	6.73 (br)	6.77 (br)	-	-	-310,0
31	2.88 (dd; 13.9; 5.2) 2.76 (dd; 13.9; 7.3)	2.89 (dd; 13.9; 5.3) 2.78 (dd; 13.9; 7.9)	36.6	37.2	-
32	-	-	127.0	127.3	-
33, 33'	6.95 (d; 8.5) ¹	6.93 (d; 8.0)	130.0	130.1	-
34, 34'	6.64 (d; 8.4) ²	6.63 (d; 8.0)	114.9	114.9	-
35	-	-	155.8	155.7	-
36	9.2 (br)	9.2 (br)	-	-	-

^a chemische Verschiebung im Bezug auf Tetramethylsilan, ^b chemische Verschiebung im Bezug auf Nitromethan, ^c s= Singulett, br= breites Singulett, d= Dublett, dd= Dublett eines Dubletts, m= Multiplett, o= Oktett. ¹⁻⁴ Werte austauschbar, keine eindeutige Zuordnung möglich.

Die NMR-Untersuchung beider Substanzen bestätigte die vermutete Aminosäurezusammensetzung und klärte die Reihenfolge ihrer Zusammensetzung (Abbildung 38). Im Unterschied zu Antipain war jedoch der Argininrest an der Carbamidfunktion unter Ausbildung eines Guanidinrings oxidiert. Die abschließenden MS-MS Spektren der Substanzen AC1.1, AC1.2 und AC2.3, bestätigten die mittels NMR aufklärte Struktur der SPI_{ac}-Derivate sowie die strukturelle Übereinstimmung von AC1.1 und AC1.2 (Spektrum nicht gezeigt).

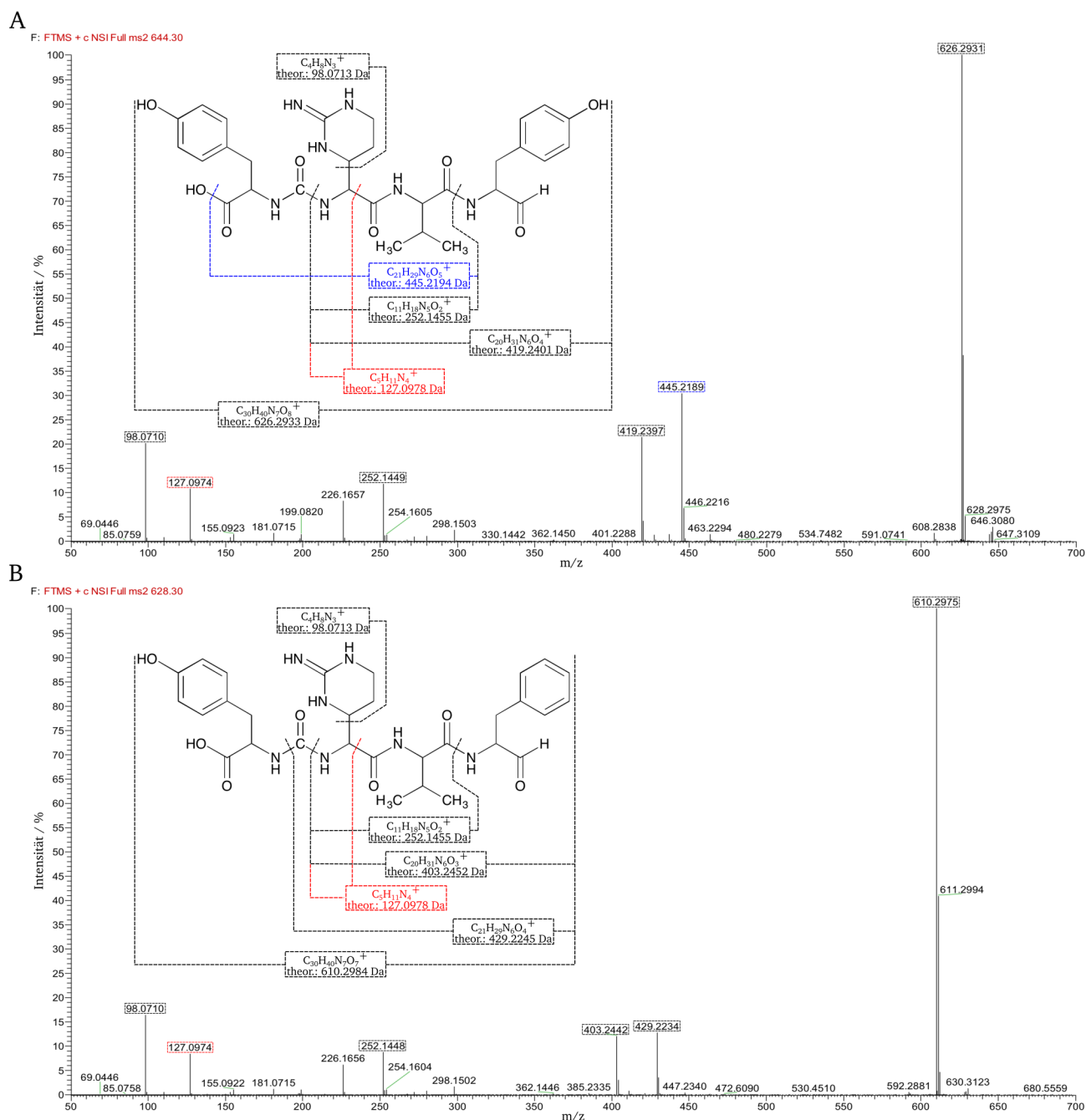


Abbildung 39: MS-MS Analyse von SPI_{ac}-Isolaten.

Die Fragmentierung wurde mittels *Higher-energy Collisional Dissociation* (HCD) und *Collision-Induced Dissociation* (CID) mit N₂ oder He herbeigeführt. Die HCD erfolgte mit unterschiedlich hohen Energieeinträgen (HCD28, HCD35 und HCD45) und führte so zu unterschiedlichen Fragmentierungsmustern. Gezeigt sind Überlagerungen der unterschiedlichen HCD sowie CID35 Fragmentierungsmuster des jeweiligen Hauptpeaks aus der MS (Substanz mit Wasseranlagerung). Für signifikante Peaks erfolgte die Zuordnung der wahrscheinlichsten Fragmentstrukturen abgeleitet aus der vollständigen Struktur. A) AC1.1 mit dem Hauptmassepeak m/z von 644.30. B) AC2.3 mit einem Hauptmassepeak m/z von 628.30.

Ein Datenbankabgleich der ermittelten SPI_{ac}-Strukturen *via* SciFinder zeigte einen hohen strukturellen Verwandtschaftsgrad der Derivate zu Chymostatin B. Chymostatin ist ein starker Chymotrypsin-Inhibitor der 1970 durch Umezawa *et al.* aus *Streptomyces hygroscopicus* und *Streptomyces lavendulae*

isoliert und beschrieben wurde [144]. Neben der Inhibierung der Serinprotease Chymotrypsin zeigt er eine etwas schwächere inhibitorische Aktivität gegenüber Papain.

Strukturell betrachtet weisen beide SPI_{ac}-Derivate sowohl Elemente der Chymostatin- als auch der Antipain-Derivate auf. Wie anfänglich vermutet, erfolgt die Inhibierung des Papains sehr wahrscheinlich durch Ausbildung eines Thiohalbacetals zwischen der Aldehydfunktion des SPI_{ac} und des im aktiven Zentrum befindlichen Cystein. Ebenso liegt eine charakteristische Carbamid-Bindung zwischen dem Tyr4 und dem oxidierten zyklischen Arg3 vor. Weitere Strukturbestandteile finden sich sowohl im Antipain und Antipain Y (terminales Tyr4 und Val2) sowie im Chymostatin B (zyklisches Arg3 und Valin2) wieder (Abbildung 40). Die größte strukturelle Übereinstimmung (94%) ergibt sich jedoch mit Chymostatin B.

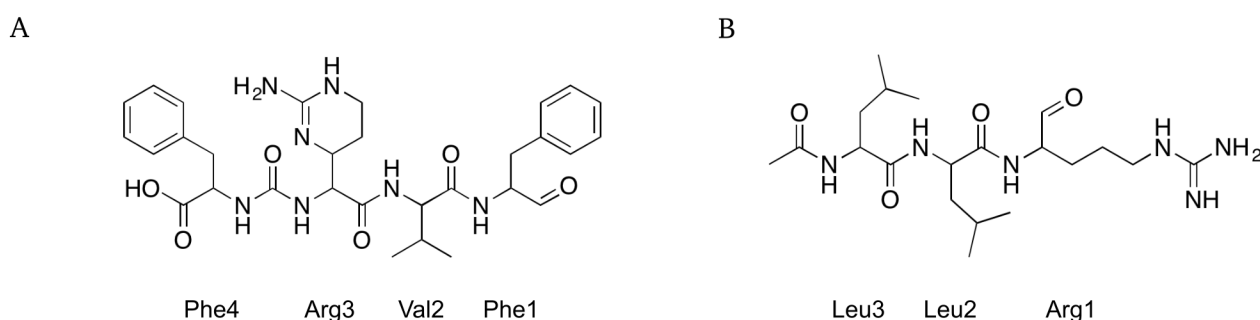


Abbildung 40: Struktur von Chymostatin B und Leupeptin.

A) Grundstruktur von Chymostatin B und B) Leupeptin mit Benennung der Aminosäuren im 3-Buchstabencode.

Chymostatin hat die größte Affinität zum namengebenden Chymotrypsin, Holo-SPI aus dem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* zu Papain. Entsprechend erfolgte die biochemische Charakterisierung der SPI_{ac}-Derivate gegenüber Papain und Chymotrypsin im Vergleich mit Antipain und Chymostatin. Als zusätzlicher Referenz-Inhibitor wurde Leupeptin mitgeführt.

Leupeptin ist ein sehr gut charakterisierter peptidischer Inhibitor der von vielen Streptomyceten-Stämmen produziert wird [145] (Abbildung 40B). 1993 gelang Schröder *et al.* die Kokristallisation des Leupeptin mit Papain (PDB: 1POP) und somit die strukturelle Beschreibung der Bindung des Inhibitors [146]. Er gehört wie Antipain und Chymostatin zur Klasse der Peptidaldehyde und inhibiert ebenfalls Serin- und Cysteinproteasen [147]. Bei Peptidaldehyden erfolgt die Inhibierung durch Ausbildung von Hemiacetalen bzw. Hemithioacetalen die die Struktur des reaktiven Übergangszustandes bei der proteolytischen Spaltung simulieren. Der direkte Nachweis der reversiblen Ausbildung kovalenter Halbacetale zwischen Peptidaldehyden und dem Nukleophil im aktiven Zentrum von Proteasen wurde erstmals 1975 durch Schultz und Cheerva anhand der pH-abhängigen Bindung von Hydrozimtaldehyd an Chymotrypsin [148] erbracht. Weiterführende Studien unterstützen den in Abbildung 41 gezeigten Mechanismus. Die dehydratisierte Form des Peptidaldehyds bindet im ersten Schritt an die Protease um den nicht-kovalenten Michaelis-Komplex (IA) zu bilden und anschließend

zum neutralen Hemiacetal bzw. Hemithioacetal (IIB) mit dem Serin-/Cysteinrest im aktiven Zentrum der Protease zu reagieren [147] (Abbildung 41).

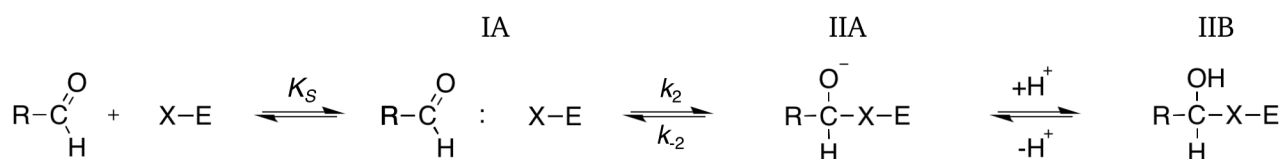


Abbildung 41: Mechanismus der Peptidaldehyd-Inhibierung von Serin- und Cysteineproteasen.

Die dehydratisierte Form des Aldehyds bindet zuerst am aktiven Zentrum des Enzyms unter Bildung des nichtkovalenten Michaelis-Komplexes (IA) und reagiert in einem zweiten Schritt mit dem Nukleophil des aktiven Zentrums (X = OH oder S⁻) unter reversibler Bildung des neutralen Hemiacetals oder Hemithioacetals (Struktur IIB) [147].

Um die räumliche Struktur der SPI_{ac}-Derivate und ihre Lage im aktiven Zentrum von Papain zu untersuchen, erfolgte die Kokristallisation der Isolate AC1.1 und AC2.3 mit Papain am Institut für Pharmazeutische Chemie an der Goethe Universität Frankfurt durch Dr. Krämer. Dazu wurde Papain mit einem 5-fachen molaren Überschuss des jeweiligen Inhibitors inaktiviert und nach Entfernung nicht gebundener Inhibitormoleküle mittels Zentrifugationskonzentratoren auf 30 mg/ml konzentriert. Die Kristallisation erfolgte mittels *sitting-drop*-Dampfdiffusionsverfahren. Für beide Komplexe wurden Kristalle erhalten, jedoch konnten nur für Papain mit dem Peptid AC2.3, das ein Phenylalaninal anstelle eines Tyrosinals enthält, auswertbare Datensätze generiert werden. Die Kristalle mit Papain und AC1.1 zeigten zwar zusätzliche Elektronendichte im aktiven Zentrum von Papain, die Auflösung reichte jedoch nicht für die Strukturaufklärung.

Der Papain-AC2-Komplex kristallisierte in der Raumgruppe P2₁2₁2₁ und streute mit einer Auflösung von 1.70 Å. Die Struktur konnte unter Verwendung von Papain (PDB: 9PAP) als molekulares Ersatzmodell durch Dr. Krämer gelöst werden. Die Überlagerung der generierten Struktur mit der Struktur des aktiven Papains (PDB: 9PAP) weist lediglich eine mittlere quadratische Abweichung von 0.276 Å auf. Die Bindung des Inhibitors führt dem zu Folge zu keiner gravierenden strukturellen Änderung der Protease. AC2 lag in der Kristallstruktur kovalent gebunden vor. Aufgrund der Struktur von AC2 war ein Inhibierungsmechanismus vergleichbar mit dem anderer Aldehydpeptide wahrscheinlich (Abbildung 41). Als Vergleich diente deshalb der Papain-Leupeptin-Komplex, dessen Struktur durch Schroeder *et al.* 1993 aufgeklärt wurde [146]. Wie bei Leupeptin erfolgt die Stabilisierung und Bindung des AC2 im aktiven Zentrum über Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 42D) sowie zahlreiche hydrophobe Interaktionen mit den umliegenden Aminosäuren [146]. Die Elektronendichte zeigte, dass das Aldehydpeptid mit Cys25 von Papain ein tetraedrisches Hemithioacetal gebildet hatte und der Sauerstoff zur Oxyanion-Tasche im aktiven Zentrum ausgerichtet war. Die Bindung des AC2 durch Cystein erfolgte auf der S-Bindungsseite des Papains [149], was sich mit Beobachtungen anderer inhibierter Kristallstrukturen deckt [150-153]. Der hydrophobe Benzylrest war dabei zu Asn64 und Gly65 (S1-Bindungstasche) orientiert. Die

S2-Bindungstasche innerhalb des aktiven Zentrums von Papain wird durch die Seitenketten von Tyr67, Pro68, Val133, Val157 und Phe207 gebildet. Der Val2-Isopropylrest von AC2 war zur S2-Bindetasche ausgerichtet und zeigte hydrophobe Wechselwirkungen mit Val133 und Pro68. Schließlich ging das zyklische Arginin in Position P3 des AC2 wiederum hydrophobe Wechselwirkungen mit Tyr61, Gly65, Gly66 sowie Tyr67 ein. Die Ausbildung stabilisierender Wasserstoffbrücken erfolgte nur mit dem Peptidrückgrat des AC2, das mit den Aminosäuren Cys25, Gly66, und Asp158 sowie der Seitenkette des Trp69 interagierte (Abbildung 42). Die Lage des AC2 stimmte in den Positionen P1 (Phe1) und P2 (Val2) im Bereich des Peptidrückgrates sehr gut mit der Ausrichtung von Leupeptin (PDB: 1POP) überein, wich jedoch signifikant in der zweiten Peptidhälfte davon ab [146]. Die Auswertung der B-Faktoren zeigte, dass die Flexibilität des gebundenen Inhibitors im Bereich der Carbamidfunktion und von Tyr4 im Vergleich zum restlichen Molekül zunimmt und sich somit die Bestimmungsmaß reduziert (Abbildung 42C). Die Röntgenstrukturanalyse des Papain-AC2-Komplexes bestätigt jedoch sehr gut den theoretischen Bindungsmechanismus des AC2 und die durch NMR und MS analysierte AC2-Struktur.

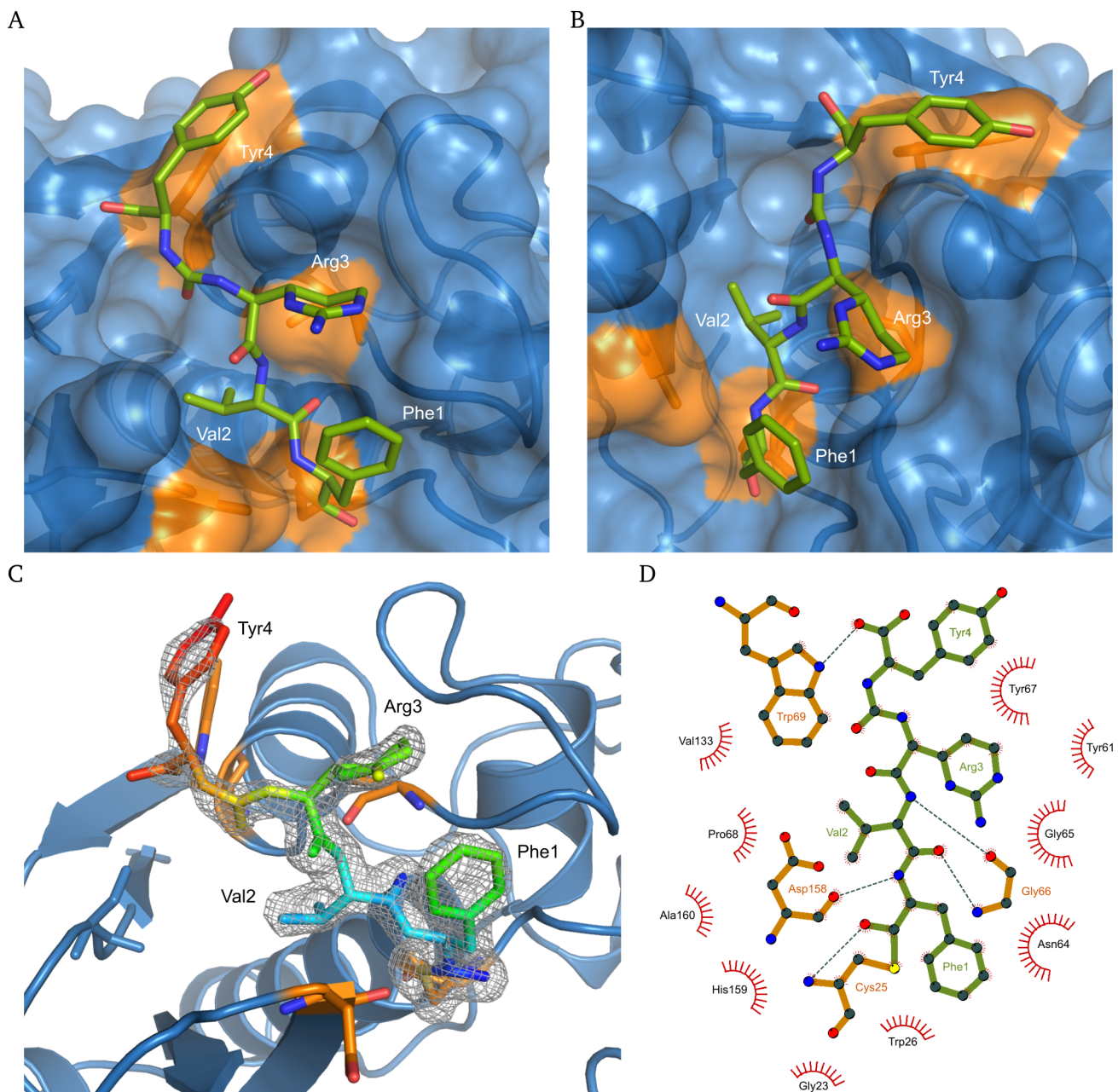


Abbildung 42: Kristallstruktur des Papain-AC2 Komplexes.

A-B) zeigt die Struktur des an Papain gebundenen AC2 aus unterschiedlichen Blickwinkeln. Aminosäuren die sehr wahrscheinlich Wasserstoffbrücken zu AC2 ausbilden sind orange eingefärbt. C) Die 2F_o-F_c-Elektronendichte ist in grau dargestellt und bei 1 σ konturiert. Die Farbgebung des AC2 ist abhängig von den B-Faktoren graduiert. Niedrige B-Faktoren sind in blau mit einem Farbverlauf hin zu rot für hohe B-Faktoren dargestellt. D) Papain-AC2-Wechselwirkung analysiert durch Ligplot+ [154]. Die AC2-Reste sind in grün dargestellt, gestrichelte Linien kennzeichnen wahrscheinliche Wasserstoffbrückenbindungen mit orange markierten Aminosäuren des Papains. Rote Bögen mit Strichen, die zu AC2-Atomen abstrahlen, stellen hydrophobe Kontakte dar.

Um die Bindungseigenschaften der Inhibitoren zu charakterisieren, wurde Papain mit einem 10-fachen molaren Überschuss der jeweiligen Standardinhibitoren sowie AC1.1 und AC2.3 inkubiert und anschließend die Schmelztemperatur der jeweiligen Protease bestimmt. Die Schmelzpunkte wurden doppelt bestimmt, wobei sich die Schmelzpunkte vergleichbarer Ansätze max. um 0.1 °C voneinander unterschieden (Tabelle 16). Grundlage für diese Untersuchung bildet die Beeinflussung der Stabilität

eines Proteins durch Bindung eines Liganden oder Inhibitors [155, 156]. Dabei kommt es oft zu einer Stabilisierung der Proteinstruktur durch verstärkte Interaktionen innerhalb des Proteins und durch die Wechselwirkungen mit dem Liganden.

Tabelle 16: Schmelzpunktbestimmung von Papain und Chymotrypsin in Gegenwart von SPI_{ac}

Protease	Inhibitor	Schmelzpunkt ¹ °C
Papain	-	75.5
	Antipain	76.4
	Leupeptin	76.5
	Chymostatin	76.8
	AC1.1	76.4
	AC2.3	76.4
Chymotrypsin	-	54.4
	Antipain	56.1
	Leupeptin	54.6
	Chymostatin	69.5
	AC1.1	69.5
	AC2.3	67.9

¹ Der Schmelzpunkt von 20 μ M der jeweiligen Protease wurde in Gegenwart von 200 μ M Inhibitor sowie ohne Inhibitor nach 15 min Inkubation auf Eis untersucht. Es erfolgte eine Doppelbestimmung der Proben. Für Papain erfolgte die Bestimmung in 50 mM Na Phosphat pH 6.8, 10 mM EDTA, 2 mM DTT und für Chymotrypsin in 100 mM Tris HCl pH 7.8, 10 mM CaCl₂.

Papain ohne gebundenen Inhibitor wies bereits einen verhältnismäßig hohen Schmelzpunkt von 75.5 °C auf (Tabelle 16). Vermutlich führte daher die Bindung der Inhibitoren an das Papain nur zu einer geringfügigen Erhöhung des Schmelzpunktes im Bereich von 0.9 – 1.3 °C, wobei Chymostatin Papain am stärksten stabilisierte.

Vergleichend mit Papain hatte Chymotrypsin einen um ca. 21 °C niedrigeren Schmelzpunkt. Die Inhibierung mit Chymostatin und den SPI_{ac}-Derivaten führte zu einer signifikanten, ligandabhängigen Stabilisierung der Proteinstruktur und zu einer Schmelzpunkterhöhung um ca. 14.6 °C. Beachtenswert erscheint, dass Chymotrypsin mit dem Inhibitor AC2.3 gegenüber Chymotrypsin mit AC1.1 bereits bei etwas niedriger Temperatur denaturierte. Antipain und Leupeptin hatten im Vergleich zu den anderen Proteaseinhibitoren nur einen sehr schwachen Effekt (Erhöhung um 0.2 - 1.7 °C) auf die Proteinstruktur des Chymotrypsins. Die ausbleibende stabilisierende Wirkung von Antipain und Leupeptin führte zu dem Schluss, dass sehr wahrscheinlich keine (Leupeptin) oder nur eine schwache Bindung (Antipain) der Inhibitoren an Chymotrypsin stattfand.

Um eine Einschätzung der inhibitorischen Wirkung der isolierten Substanzen sowie der Referenzinhibitoren (Antipain, Chymostatin und Leupeptin) zu ermöglichen, wurde eine IC₅₀-Bestimmung nach Vorinkubation von Protease und Inhibitor durchgeführt (Abbildung 43). Diese

Messungen ermöglichten die Untersuchung auf generelle Eignung als Inhibition für die jeweilige Protease, eignen sich jedoch nicht für die Bestimmung kinetischer Parameter.

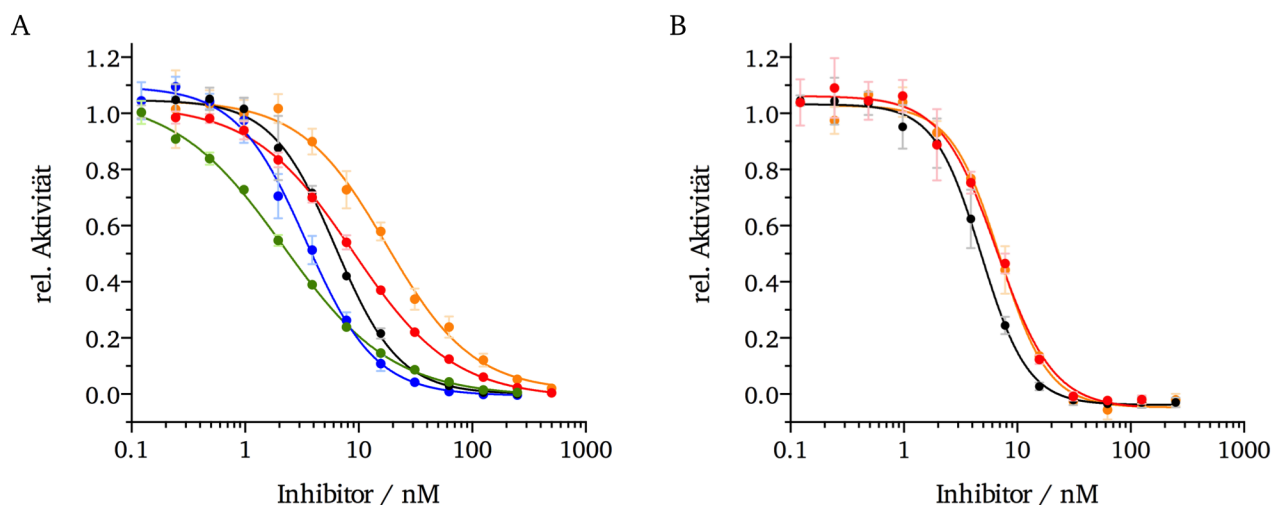


Abbildung 43: IC₅₀-Bestimmung der SPI_{ac}-Isolate mit Papain und Chymotrypsin.

Bestimmung des inhibitorischen Einflusses von Antipain (blau), Leupeptin (grün), Chymostatin (rot), AC1.1 (schwarz) und AC2.3 (orange) gegenüber Papain A) und Chymotrypsin B). Die inhibitorische Aktivität wurde nach 15 min Vorinkubation von Protease und Inhibitor bestimmt. A) Die Hydrolyse von 50 μ M Z-Phe-Arg-AMC in 50 mM Na Phosphat pH 6.8, 10 mM EDTA, 2 mM DTT durch 1.5 nM Papain wurde in Gegenwart von 0.12 – 500 nM des jeweiligen Inhibitors bei 30 °C verfolgt. Die Auswertung der kontinuierlichen Messung erfolgte linear zwischen 5 – 15 min. B) Die Hydrolyse von 150 μ M Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC in 100 mM Tris HCl pH 7.8, 10 mM CaCl₂ durch 1.5 nM Chymotrypsin (Sigma Aldrich) wurde in Gegenwart von 0.06 – 250 nM des jeweiligen Inhibitors bei 30 °C verfolgt. Die Auswertung der kontinuierlichen Messungen erfolgte linear zwischen 1 – 5 min. Antipain und Leupeptin zeigten in Vorversuchen keine inhibitorische Aktivität gegenüber Chymostatin und sind nicht dargestellt.

Die Bestimmung der inhibitorischen Konzentration, bei der 50% der Papain-Moleküle inaktiviert vorlagen, bestätigte die inhibitorische Aktivität der SPI_{ac}-Derivate sowie von Antipain, Leupeptin und Chymostatin (Abbildung 43A). Antipain und Leupeptin wiesen mit Konzentrationen von 3.44 ± 0.20 nM bzw. 2.17 ± 0.10 nM die niedrigsten IC₅₀-Werte auf. Chymostatin und AC1.1 waren mit 8.88 ± 0.31 nM und 6.25 ± 0.32 nM nahezu identisch und nur geringfügig schwächere Inhibitoren als Leupeptin und Antipain. Unter den untersuchten Wirkstoffen war AC2.3 mit einem IC₅₀ von 17.8 ± 1.68 nM der schwächste Inhibitor. Alle fünf Substanzen sind jedoch mit IC₅₀-Werten im unteren nanomolaren Bereich sehr potente Inhibitoren für die Cysteinprotease Papain.

Die Untersuchung auf inhibitorische Aktivität gegenüber Chymotrypsin ergab, dass Antipain und Leupeptin im untersuchten Konzentrationsbereich ($< 30 \mu$ M) keine inhibitorische Wirkung auf die Serinprotease besitzen. Chymostatin (IC₅₀ = 6.67 ± 0.47 nM), AC1.1 (IC₅₀ = 4.811 ± 0.23 nM) und AC2.3 (IC₅₀ = 7.01 ± 0.31 nM) hingegen sind sehr potente Chymotrypsin-Inhibitoren und weisen einen nahezu identische IC₅₀ von unter 10 nM auf (Abbildung 43B).

Durch den gewählten Reinigungsprozess von SPI_{ac} aus dem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* mit Abreicherung von SPI_p stellte sich abschließend die Frage, ob die identifizierten Substanzen AC1 und AC2 Bestandteil des ursprünglich isolierten Holo-SPI sind und an SPI_p binden. Zunächst wurde Holo-

SPI aus *S. mobaraensis* für eine massenspektrometrische Untersuchung zum Nachweis des AC1 und AC2 an das Karlsruher Institut für Technologie gegeben. Die dort von Marius Muth durchgeführte MS-TOF-Analyse belegte zweifelsfrei das Vorhandensein von AC1 und AC2 in der Holo-SPI-Probe (Abbildung 44). Eine zusätzliche TOF-MS-MS-Analytik (Ergebnisse nicht gezeigt) identifizierte erneut AC1 und AC2 als Bestandteile des aus dem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* isolierten Holo-SPI.

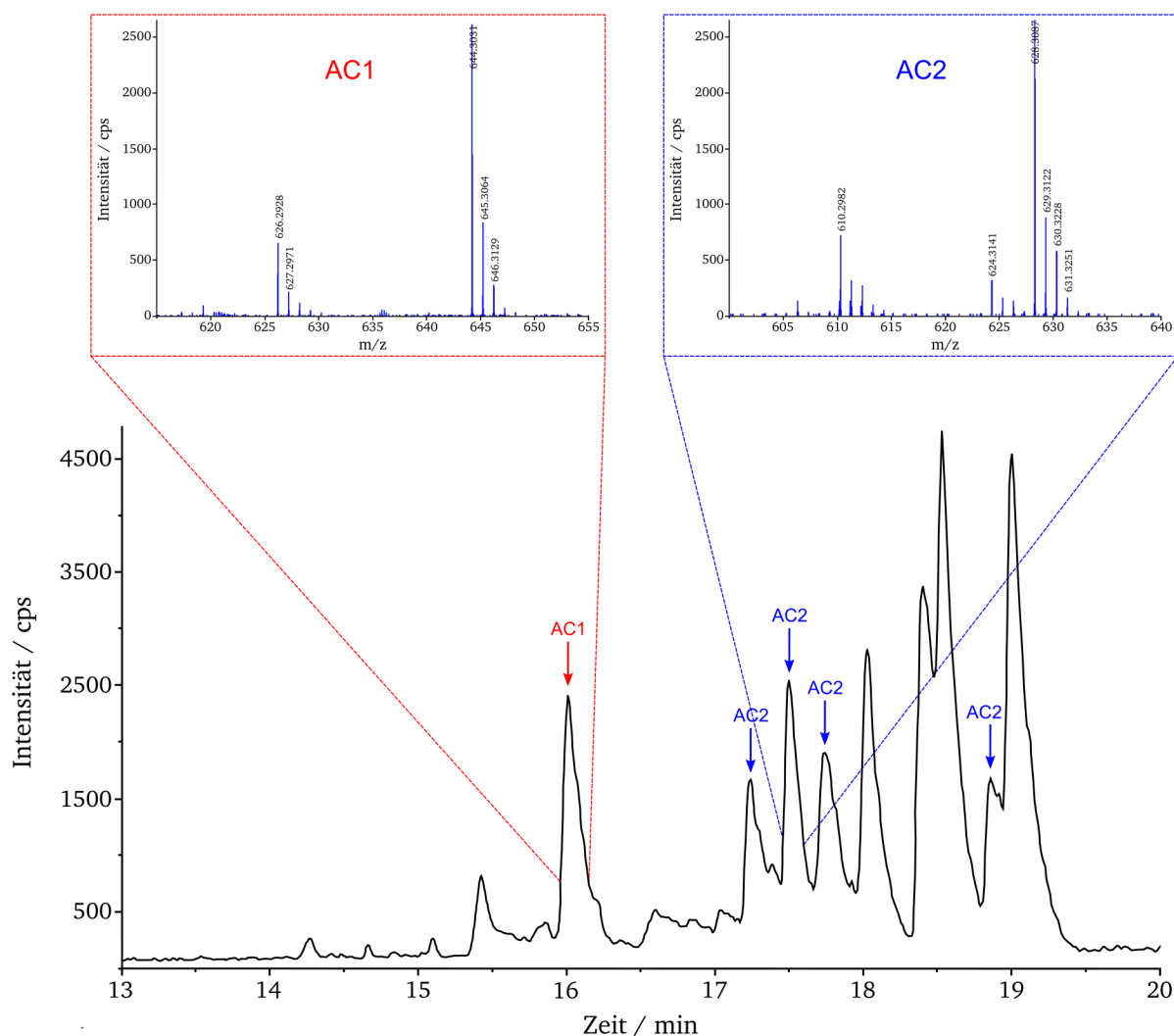


Abbildung 44: MS-Untersuchung von Holo-SPI aus dem Kulturüberstand von *S. mobaraensis*.

Die Vorbereitung der Probe sowie die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte am Karlsruher Institut für Technologie durch Marius Muth. Für die Abtrennung der Proteinbestandteile des Holo-SPI wurde eine Fällung mit 90% Methanol durchgeführt. Anschließend wurde mit einem Rotationsverdampfer das Methanol bei 30 °C für 3 – 4 h entfernt. Die chromatographische Trennung der Proben erfolgte über eine Multospher 120 RP 18-AQ-5 μ -Säule mit darauffolgender ESI-QTOF Detektion. Das Diagramm zeigt die eluierenden Massen (Intensität in Counts pro Sekunde (cps)) selektiv im Bereich von 610.0 – 645.0 m/z über die Zeit. Die Einschübe zeigen die Aufsummierung der Molekülmassen über den markierten Zeitraum. Eine anschließende TOF-MS-MS Analyse ermöglichte die eindeutige Zuordnung der Massen zu AC1 und AC2 (Ergebnisse nicht gezeigt).

Um abschließend die Interaktion zwischen den isolierten SPI_{ac}-Derivaten mit dem SPI_p zu klären, wurden isothermale Titrationsexperimente durchgeführt. Dabei wurden zu 200 μ l einer 10 μ M rSPI Lösung jeweils 2 μ l einer 100 μ M SPI_{ac} (AC1 bzw. AC2) bei pH 8.0 titriert und die Änderung der

Differenzleistung zwischen Mess- und Referenzzelle detektiert. Die Messungen ergaben, dass unter den gewählten Bedingungen keine Bindung der SPI_{ac}-Derivate an den SPI_p stattfand. Das ITC-Ergebnis legte nahe, dass die ionische Bindung von SPI_{ac} und SPI_p an Fractogel EMD SO₃⁻ bei pH 4.0 zufällig ähnlich stark ist, was ohne notwendige Interaktion von Protein und Peptid, eine gemeinsame Elution verursacht. Für diese Interpretation spricht auch, dass mit dieser Arbeit eine Methode etabliert wurde, mit der SPI_{ac} und SPI_p Basis-getrennt eluiert werden können (vgl. Abschnitt 3.4.2).

3.4.4. Reinigung des rekombinanten SPI_p

Nach Aufklärung der SPI_{ac}-Struktur erfolgte die Charakterisierung des SPI-Proteins. Für die strukturelle Analyse wurde für SPI_p ein rekombinantes Reinigungsverfahren ohne Rückfaltung aus Einschlusskörpern und ohne Strukturmodifikationen wie beispielsweise Affinitätstags etabliert. Hierzu wurden *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen mit dem Plasmid pET22b(+)-SPI_{opt} transformiert. Die Proteinexpression erfolgte in 1 l LB-Medium über 5 h bei 28 °C nach Induktion mit 1 mM IPTG. Nach Zellernte, Ultraschallaufschluss und pH-Präzipitation von *E.-coli*-Proteinen bei pH 5.3 begann die chromatographische Reinigung des rSPI bei RT (Abbildung 45).

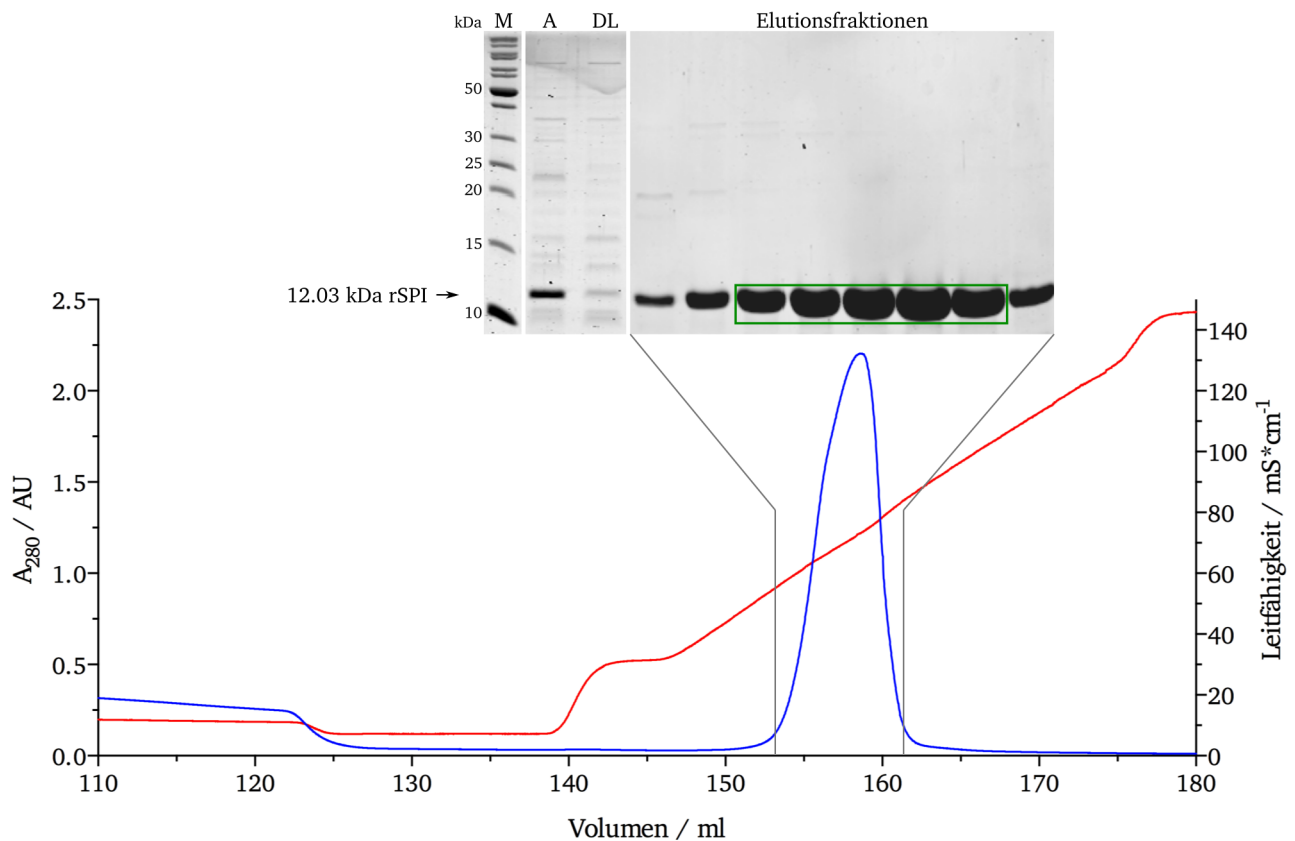


Abbildung 45: Chromatogramm und SDS-PAGE der IAC von rSPI.

Trennung des Überstandes der Präzipitation bei pH 5.3 mittels einer 3 ml Fractogel- SO_3^- -Säule (Merck) bei RT. Die Reinigung erfolgte mit 1 ml/min und einem initialen Stufengradienten auf 150 mM NaCl und linearem Gradient von 0.15 – 0.9 M NaCl in 50 mM Na Acetat pH 5.3. Die Leitfähigkeit ist als rote Linie und die Proteinabsorption bei 280 nm als blaue Linie dargestellt. Im Anschluss an die IAC folgte die Analytik mittels 15%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Für die Größenzuordnung wurde eine Molekulargewichtsmarkermischung (M) mitgeführt. Der Auftrag (A) und die nicht bindenden Proteine als Durchlauf (DL) sind gekennzeichnet. Vereinigte Fraktionen sind durch einen grünen Kasten markiert.

Die der IAC vorangehende pH-Präzipitation durch Ansäuern mit Essigsäure auf pH 5.3 führte zu einer sehr effizienten Abtrennung der Wirtszellproteine. Die anschließende IAC ergab rekombinantes SPI-Protein mit einer Reinheit größer 95%. Entsprechende Fraktionen wurden vereinigt und mit Zentrifugationskonzentratoren für die anschließende GPC auf ca. 1 ml eingengt.

Das Konzentrat der IAC-Reinigung wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min über eine 120 ml Superdex 75 pg *HiLoad* 16/600-Säule (GE Healthcare) chromatographisch gereinigt. Damit wurde simultan der finale Pufferwechsel und die Abtrennung restlicher *E. coli*-Proteine sichergestellt.

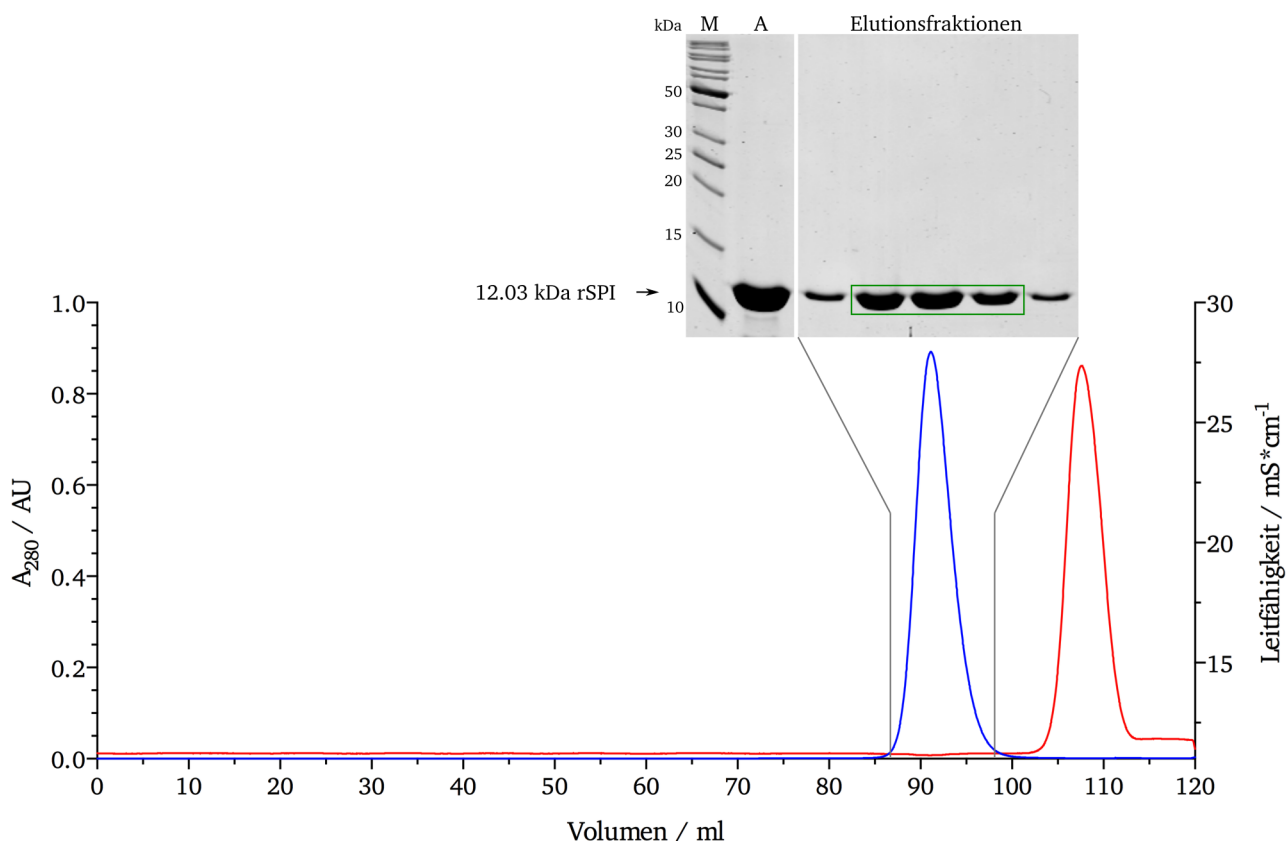


Abbildung 46: Chromatogramm und SDS-PAGE der GPC von rSPI.

Auftrag des Konzentrates der IAC auf eine 120 ml Superdex 75 pg *HiLoad* 16/600-Säule (GE Healthcare) bei RT. Die Reinigung erfolgte mit 1 ml/min in 50 mM Tris HCl pH 8.0 mit 100 mM NaCl. Die Leitfähigkeit ist als rote Linie und die Proteinabsorption bei 280 nm als blaue Linie dargestellt. Die Analytik erfolgte mit 15%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Für die Größenzuordnung wurde ein Molekulargewichtsmarker (M) mitgeführt. Der Auftrag (A) ist gekennzeichnet und gereinigte Fraktionen sind durch einen grünen Kasten markiert.

Die Analytik mittels SDS-PAGE zeigte die vollständige Reinigung von rSPI mit einer apparenten Molmasse von ca. 12 kDa. Im Vergleich dazu ergab das GPC-Elutionsvolumen von 91.5 ml eine etwas geringere apparente Molmasse von 9 kDa. Da der SPI_p über keine bekannte katalytische Funktion verfügt, wurde die strukturelle Integrität des rekombinant produzierten SPI_p über die vergleichende Messung des Schmelzpunktes mit dem SPI_p aus *S. mobaraensis* sichergestellt. Beide Proteine wiesen einen charakteristisch hohen Schmelzpunkt von über 84 °C auf. Die SPI-Variante aus *S. mobaraensis* lag mit 85 °C um nur 0.8 °C über dem Schmelzpunkt der rekombinanten Variante. Das rekombinante Produktionsverfahren eignete sich dem entsprechend für die Produktion von gentechnisch veränderten SPI_p-Varianten für die Strukturaufklärung.

3.4.5. Strukturaufklärung des SPI_p

Den ersten Schritt in der Aufklärung von Struktur und Funktion des SPI_p stellte die Analyse und der Vergleich der SPI_p-Primärsequenz mit verwandten Streptomyceten-Proteinen dar. Die Primärsequenz des SPI_p besteht aus einem 33 Aminosäuren langen Signalpeptid und einem 110 Aminosäuren langen

reifen Enzym (Abbildung 47). Gene für orthologe Proteine finden sich im Genom vieler Streptomyceten. Bemerkenswert ist, dass *S. mobaraensis* darunter der einzige Transglutaminase-Produzent ist. Alle ausgewählten Proteinsequenzen beinhalten 4 Cysteine, die sehr wahrscheinlich zu der beobachteten hohen Thermostabilität beitragen. Ein konserviertes Cystein-Motiv KCPXC (X kann für Gly oder Ser stehen) im hinteren Drittel ist besonders auffällig und ähnelt dem invers konfigurierten, N-terminal aktiven CGPCK-Motiv der Oxidoreduktase Thioredoxin (Trx1, P0AA25, *E. coli*).



Abbildung 47: Sequenzvergleich von SPI_p mit putativen *Streptomyces*-Proteinen.

Vergleich von 1, P86242, *S. mobaraensis* mit 2, Q9X5U4, *S. lavendulae*; 3, A0A0L8NMC1, *S. griseoflavus*; 4, A0A0M8QYC6, *S. rimosus subsp. rimosus*; 5, A0A0L8PS48, *S. aureofaciens*; 6, K4QWL3, *S. davaonensis*; 7, F8JME3, *S. cattleya*. Die Überlagerung wurde mit Clustal Ω V 1.2.4 erstellt. Cysteine (grün), Glutamine (rot) und Lysine (blau) sind hervorgehoben. Das durch Edman-Abbau bestimmte N-terminale Peptid ist rot unterstrichen [55]. Das inverse Thioredoxin-Motiv ist schwarz eingrahmt.

Durch vergleichende Röntgenstrukturanalyse von Kristallen des rekombinanten sowie des nativen SPI_p aus *S. mobaraensis* am Helmholtz-Zentrum für Injektionsforschung (HZI) in Braunschweig durch Dr. Scrima und Dr. Schmelz gelang die 3D-Strukturaufklärung des SPI_p. Wildtyp-SPI_p aus *S. mobaraensis* kristallisierte in der Raumgruppe P2₁2₁2₁ mit zwei Monomeren pro asymmetrischer Einheit und resultierte in Beugungsdaten mit einer Auflösung von 1.5 Å. Rekombinant produzierter SPI_p hingegen, kristallisierte in der Raumgruppe P1 mit vier Monomeren pro asymmetrischer Einheit und generierte Beugungsdaten mit einer Auflösung von 2.4 Å. Die Struktur konnte unter Verwendung der D1-Domäne des Expansins von *Clavibacter michiganensis* (PDB 4JCW) als molekulares Ersatzmodell gelöst werden. Die Strukturen des SPI_p aus *S. mobaraensis* und *E. coli* sind über weite Teile identisch (Anhang: Abbildung 62). Der Vergleich beider Strukturen weist lediglich eine mittlere quadratische Abweichung von 0.30 – 0.38 Å auf. Aus diesem Grund basiert die weitere Beschreibung der SPI_p-Struktur auf der höher aufgelösten Struktur des SPI_p aus *S. mobaraensis*. Ein komplettes Modell des SPI_p mit allen Aminosäureresten (1 - 110) wurde durch Dr. Schmelz und Dr. Scrima am HZI erstellt [157]. Die Struktur von SPI_p umfasst eine einzelne Domäne mit acht β-Strängen, einer α-Helix und vier 3₁₀-Helices sowie zwei durch Cys23 / Cys53 und Cys75 / Cys78 gebildete Disulfidbrückenbindungen

(Abbildung 48A). SPI_p und die D1-Domäne des Expansins haben eine Sequenzidentität von 30% und überlagern gut mit einer mittleren quadratischen Abweichung von 0.75 Å (Abbildung 48B, C). Expansin D1 und SPI_p weisen beide eine Doppel-Psi-Beta-Barrel (DPBB)-Domäne auf, die zuerst für die Strukturen von Barwin, einem Pflanzenabwehrprotein, und die Endoglucanase V von *Humicola insolens* beschrieben wurde [158, 159]. Die DPBB-Domäne findet sich auch in der konservierten N-terminalen Domäne des seltenen Lipoproteins A (RlpA), einer lytischen Transglycosylase, die am Zellteilungsprozess von *Pseudomonas aeruginosa* beteiligt ist [160]. Neben der enzymatischen Funktionalität wurde auch eine Beteiligung der DPBB-Domäne an der Cofaktor-Bindung sowie Ligandenbindung beschrieben [161]. Die DPBB-Domäne gehört zu einer Unterklasse von sechssträngigen β -Barrel-Domänen. Die Hauptdomäne ist durch zwei ineinander greifende Psi-Motive zusammengesetzt [161], wobei jedes Motiv aus drei β -Strängen besteht, die in Draufsicht dem griechischen Buchstaben Ψ ähneln. Das erste kanonische Psi-Motiv, in Abbildung 48D beispielhaft dargestellt durch die Struktur der N-terminalen Substraterkennungsdomäne der AAA ATPase VatN (VatN-N; PDB 1CZ4), wird gebildet durch β 1, β 2 und deren verbindende "Psi"-Schleife, die β 5 kreuzt [162, 163]. Gleichmaßen wird das zweite Motiv von β 4 und β 5 mit der zweiten Psi-Schleifenkreuzung β 2 gebildet (Abbildung 48D). Die lateralen Stränge β 3 und β 6 vervollständigen die sechssträngige β -Barrel-Struktur. Trotz der strukturell konservierten und zentralen DPBB-Domäne zeigen die Verbindungsschleifen zwischen den β -Strängen eine hohe Variabilität in der Zusammensetzung und der Länge der sekundären Struktur. Dies gilt für SPI_p wie für D1-Expansin und VatN-N (Abbildung 48D). Während die erste Psi-Schleife in VatN-N nur 10 Aminosäuren umfasst, ist die Schleife bei SPI_p und dem D1-Expansin auf 18 bzw. 22 Aminosäuren erweitert. Diese längeren Schleifen werden durch eine Disulfidbrücke stabilisiert (SPI_p: Cys23 / Cys53, D1-Expansin: Cys23 / Cys48), die in VatN-N nicht auftritt, da nur ein Cystein enthalten ist.

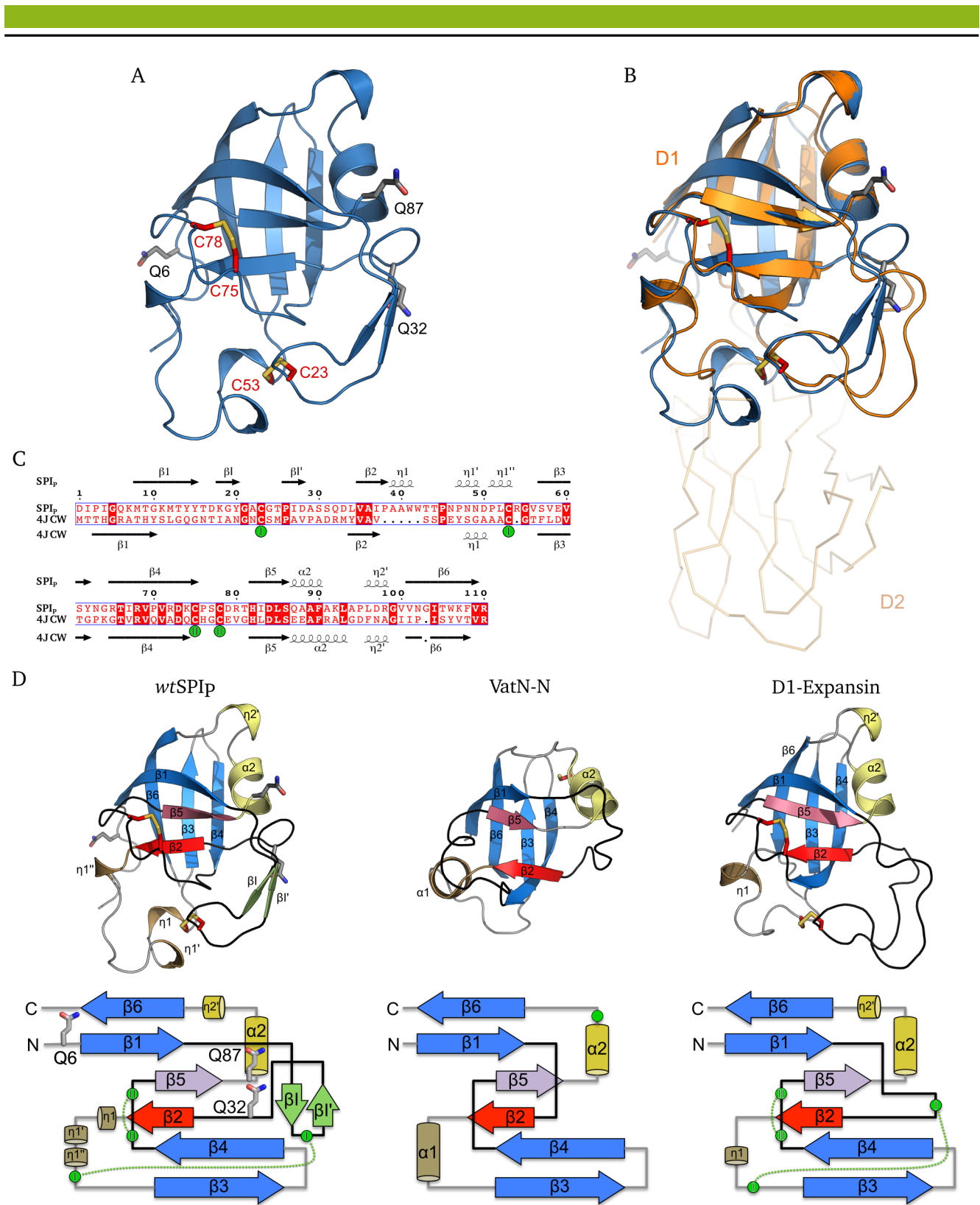


Abbildung 48: Kristallstruktur des SPI_p und Strukturvergleich mit DPBB-beinhaltenen Proteinen [157].

Abbildung 48: Kristallstruktur des SPI_p und Strukturvergleich mit DPBB-beinhaltenen Proteinen [157].

A) Cartoon Darstellung des SPI_p. Glutamine (Kohlenstoffe in grau) und Cysteine (Kohlenstoffe in rot) sind in *Stick*-Darstellung gezeigt. B) Überlagerung des SPI_p mit der N-terminalen D1-Domäne des Expansins (PDB: 4JCW). SPI_p ist in blau und das Expansin in orange eingefärbt. Die C-terminale Domäne D2 des Expansins ist in *Ribbon*-Darstellung gezeigt. C) Sequenzüberlagerung des SPI_p und dem Expansin D1 mit der Sekundärstruktur zugewiesen durch den DSSP-Algorithmus [164, 165] (η kennzeichnet eine 3_{10} -Helix). Disulfidbrücken sind nummeriert und interagierende Cysteine grün markiert. D) Proteinfaltungs- (Cartoon-Darstellung) und Strukturvergleich von SPI_p, VatN-N (PDB: 1CZ4) und der D1-Domäne des *C. michiganensis* Expansin (PDB: 4JCW). Jedes Psi-beta-Barrel besteht aus sechs β -Strängen. Die Faltblattstrukturen $\beta 2$ (rot) und $\beta 5$ (violett) stellen die zentralen Stränge jeder Psi-Schleife (schwarz) dar. β -Stränge, die Teile des doppel-psi-beta Barrels sind, sind blau dargestellt. Der SPI_p besitzt zwei kurze β -Stränge (βI und $\beta I'$, grün), die hinter $\beta 1$ eingeschoben sind. Rechtsgängige α -Helices sind sandfarben ($\alpha 1$) und gelb ($\alpha 2$) dargestellt. 3_{10} -Helices sind identisch zu den α -Helices illustriert. Cysteine in den Strukturen sind als Stäbchen mit rot markiertem Kohlenstoff gezeigt. Cysteine in der Topologie sind als grüne Kreise und zugehörige Disulfidbrücken als grüne gestrichelte Linien dargestellt. Glutaminreste sind in der SPI_p-Struktur in Stäbchendarstellung mit grauen Kohlenstoffen hervorgehoben.

3.4.6. Charakterisierung des SPI_p als MTG-Substrat

Das reife Transglutaminase(MTG)-Substrat SPI_p enthält die drei Glutamine Gln6, Gln32 und Gln87, die zum Wasser orientiert sind, sowie sechs Lysine (Lys7, Lys11, Lys18, Lys74, Lys92 und Lys107), die über die Oberfläche von SPI_p verteilt sind (Anhang: Abbildung 63). Diese Positionen sind in SPI_p-ähnlichen Streptomyceten-Proteinen hoch konserviert, mit Ausnahme von Lys7 und Lys18 (Abbildung 47). Für die Identifikation potentieller Glutamin-Donorstellen für MTG wurden rSPI_p- und $\Delta 2Q$ -Mangelvarianten (rSPI_p-Q1-Varianten) produziert. Die strukturelle Integrität der generierten SPI_p-Varianten wurde mit Hilfe der Schmelzpunkte beurteilt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Schmelzpunkte und rel. Biotinylierung von rSPI_p-Varianten.

Variante		Aminosäure- austausch	Glutamin flankierende Aminosäuren	Schmelzpunkt °C	relative Biotinylierung ¹
wtSPI _p (IAC)	Q3	kein		84.8	1.89
wtSPI _p (IAC + GPC)	Q3	kein		85.0	1.16
rSPI_p	Q3	kein		84.2	1.00
Q6	Q1	Q32N, Q87N	D IPIG Q K MTG K	68.6	0.83
Q32	Q1	Q6N, Q87N	I DASS Q D LVA I	70.4	0.04
Q87	Q1	Q6N, Q32N	H I D LS Q AAFA K	75.4	0.05
N6	Q2	Q6N	D IPIG N K MTG K	81.0	0.07
Q0	Q0	Q6N, Q32N, Q87N		64.2	0.05
G7	Q3	K7G	D IPIG Q G MTG K	82.3	13.66
A7	Q3	K7A	D IPIG Q A MTG K	85.9	2.44
D7	Q3	K7D	D IPIG Q D MTG K	83.8	0.55
rDAIP	Q5	kein		48.7	18.96
rDAIP-Q39	Q1	Q65N, Q144N, Q298N, Q345N		51.9	14.76
ungeladen → geladen					
R9	Q3	T9R	D IPIG Q K MRG K	83.3	0.55
D9	Q3	T9D	D IPIG Q K MDG K	81.6	2.13
E9	Q3	T9E	D IPIG Q K MEG K	83.4	1.76
R40	Q3	A40R		78.5	0.78
E40	Q3	A40E		82.6	1.08
R49	Q3	N49R		81.9	1.16
R55	Q3	G55R		77.6	2.05
E55	Q3	G55E		81.4	1.25
R61	Q3	S61R		79.7	2.65
E61	Q3	S61E		84.7	0.83
R105	Q3	T105R		79.3	3.96
R109	Q3	V109R		75.8	4.25
E109	Q3	V109E		78.0	1.46
Ladungsumkehr					
E65	Q3	R65E		78.5	1.27
E68	Q3	R68E		77.9	2.85
E92	Q3	K92E		74.3	1.96
R97	Q3	D97R		82.0	1.21
E107	Q3	K107E		82.2	1.46
E110	Q3	R110E		81.1	1.71

¹ 15 µM SPI_p bzw. DAIP wurden mit Monobiotinylcadaverin (200 µM) und MTG (0.3 µM) bei 37 °C für 20 h in 50 mM Tris HCl pH 8.0 mit 100 mM NaCl inkubiert. Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung und Protein-*Blotting* wurden die Proteine mit einem IRDye-800-CW-Streptavidin-Konjugat (Licor) visualisiert. Die Positivkontrolle, rSPI_p nach 20 h Inkubation, ist auf 1.00 normiert.

Der Austausch von Glutamin gegen Asparagin hatte unmittelbare Auswirkung auf die Schmelztemperatur der betreffenden Varianten. Der Austausch von 1 - 2 Glutaminen führte zum Abfall der Schmelztemperatur um 9 – 16 °C. Dies weist zweifelsfrei darauf hin, dass die enthaltenen Glutamine die SPI_p-Struktur stabilisieren. Diese Interpretation wird noch durch die D3Q-Mangelvariante (SPI_p-Q0) unterstrichen, bei der alle drei Glutamine durch Asparagine ersetzt wurden, wodurch sich die Schmelztemperatur um ca. 20 °C auf unter 65 °C erniedrigte. Die stabilisierende Wirkung der Glutaminreste lässt sich mit Hilfe der SPI_p-Struktur erklären. Die Seitenketten von Gln32 und Gln87 koordinieren mehrere Wassermoleküle und bilden intramolekulare Wechselwirkungen aus. Der Gln32-γ-Amidsauerstoff wechselwirkt mit dem α-Amidwasserstoff von Asp28 unter Bildung einer stabilisierenden H-Brückenbindung innerhalb der ersten Psi-Schleife. Die Gln87-Seitenkette

wechselwirkt über ihre γ -Carboxamid-Wasserstoffatome mit den Seitenketten- und α -Carboxylsauerstoffatomen des Ser30 unter Ausbildung von zwei zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Schleife ($\beta 4 - \beta 5$) und der ersten Psi-Schleife (Abbildung 49).

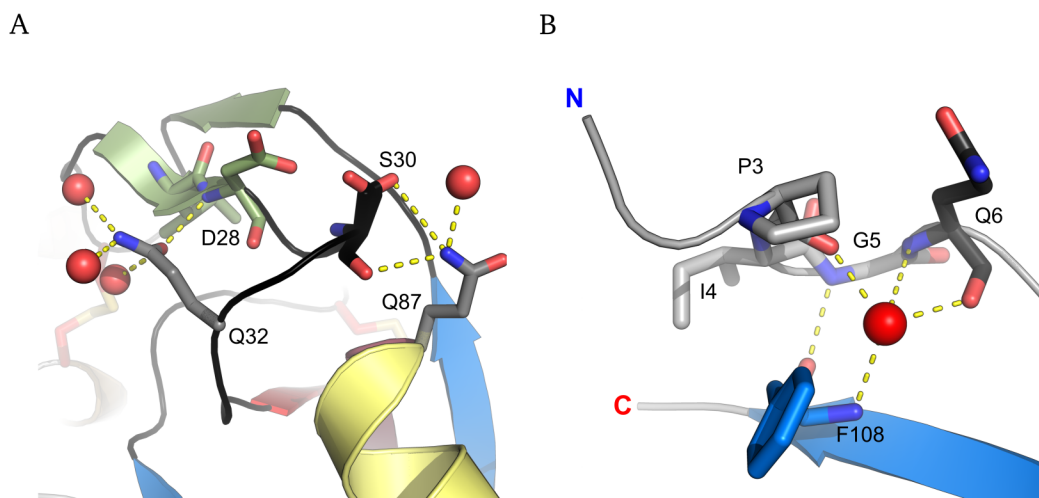


Abbildung 49: Seitenketten-Interaktionen der Glutamine des SPI_p [157].

A) Gln32 und Gln87 Seitenketteninteraktionen mit anderen Aminosäuren des SPI_p. B) Interaktionen des Q6 mit dem N-Terminus. Farbzunordnung erfolgte wie in Abbildung 48 beschrieben.

Die Störung oder Eliminierung dieser Wechselwirkungen verursacht bzw. trägt sehr wahrscheinlich zum beobachteten Abfall der Schmelztemperatur für Q1/Q0-Varianten bei. Dies belegen die Varianten, die den Austausch Gln87Asn enthalten und die geringste Schmelztemperatur aufweisen. Darüber hinaus schränken die intramolekularen Kontakte von Gln32 und Gln87 den Zugang für die MTG zur Carboxamidgruppe ein, wohingegen die Carboxamid-Seitenkette des Gln6 dem Lösungsmittel ausgesetzt ist und keine direkte Wechselwirkung (bis zu 3.5 Å) mit umgebenden Aminosäureseitenketten oder Wassermolekülen eingeht. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung führte der Austausch von Gln6 gegen Asp nur zu einem geringen Abfall der Schmelztemperatur von ca. 3 °C (Tabelle 17). Darüber hinaus ergaben die Markierungsexperimente, dass Gln6 die einzige MTG-Konjugationsstelle für den Einbau des biotinylierten Amins Monobiotinylcadaverin ist. Der Austausch Gln6Asp hob die Biotinmarkierbarkeit durch MTG vollständig auf (Tabelle 17, Abbildung 48). Interessanterweise war die relative Biotinylierung des mit *S. mobaraensis* produzierten wtSPI_p (Holo-SPI) nach IAC-Reinigung im Vergleich zum rSPI_p nach 20 h fast doppelt so hoch. Der Unterschied in der Markierungseffizienz ging jedoch verloren, wenn Holo-SPI durch GPC oder Dialyse weiter gereinigt wurde (Abbildung 50). Dieser Effekt wird deshalb vermutlich durch den Einfluss kleiner Moleküle erzeugt, die den Zugang der MTG zum wtSPI_p-Glutamin erleichtern. Effektoren können Detergenzien der Kulturbrühe sein, die wie *N*-Lauroylsarcosin und *N*-Lauroylamido-3-*N'*,*N'*-dimethylpropylamin die Markierung und Vernetzung von Proteinen durch MTG steigern können [89, 90]. Nicht auszuschließen ist aber auch, dass die Inhibitoren AC1 und AC2 die enzymatische Biotinylierung positiv beeinflussen.

Um die Vergleichbarkeit aller Varianten zu gewährleisten, wurde ein finaler GPC-Reinigungsschritt für alle Varianten durchgeführt.

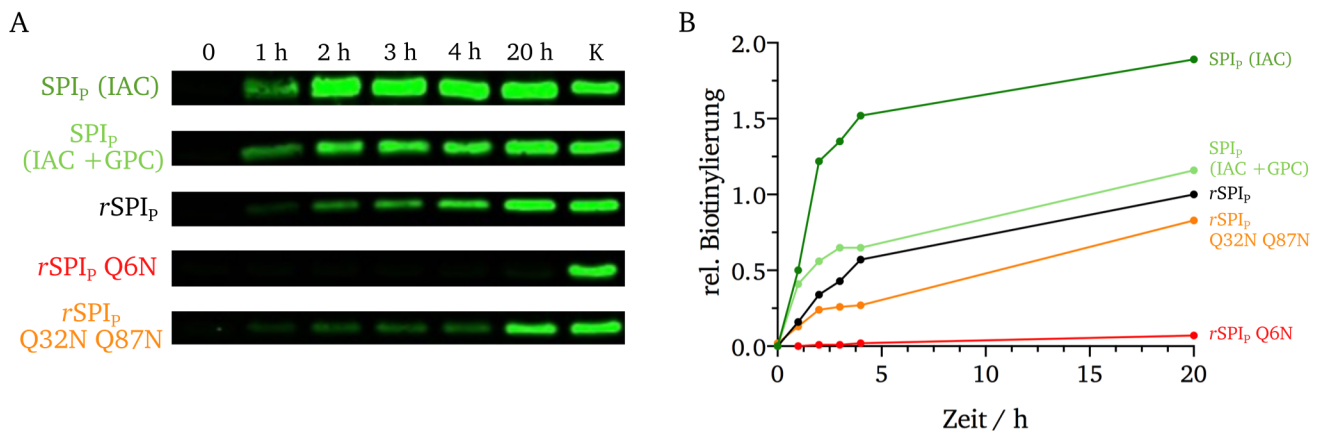


Abbildung 50: Detektion der Glutaminbindestellen am SPI_p mit MTG-vermittelter Biotinylierung [157].

wtSPI_p-Varianten sowie rSPI_p-Glutamindeletionsvarianten (15 µM) wurden mit Monobiotinylcadaverin (200 µM) und MTG (0.3 µM) bei 37 °C für die angegebenen Zeiträume in 50 mM Tris HCl pH 8.0 mit 100 mM NaCl inkubiert. Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung und Protein-Blotting wurden die Proteine mit einem IRDye-800-CW-Streptavidin-Konjugat (Licor) visualisiert. rSPI_p nach 20-h-Inkubation stellte die Positivkontrolle dar. A) Proteinblots unterschiedlicher Markierungen zu den angegebenen Zeiträumen. B) Biotinylierungsverlauf der angegebenen Proteinvarianten.

Der Unterschied in der glutaminseitigen Markierbarkeit verglichen mit dem durch Fiebig *et al.* charakterisierten MTG-Substrat, dem Dispase-Autolyse-induzierenden Protein (DAIP) [82], war besonders auffällig. Die MTG-vermittelte Biotinylierung von rDAIP und der Δ4Q-defizienten Variante rDAIP-Q39 (DAIP-Q1) wies eine 15- bis 20-fach höhere Biotinylierungsrate im Vergleich mit rSPI_p auf (Tabelle 17, Abbildung 51) [82]. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass im Gegensatz zur Hauptmarkierungsstelle am DAIP, dem Q39, alle flankierenden Sequenzen im Bereich von ± fünf Aminosäuren der drei Glutamine des SPI_p geladene Aminosäuren aufweisen, die sich negativ auf die Markierbarkeit auswirken [82]. Jedoch erfolgt beim rSPI_p, im Gegensatz zum DAIP, die Markierung selektiv an einem einzelnen Glutamin. Diese Eigenschaft ermöglichte die Verwendung des thermostabilen rSPI_p-Q3 als Basisprotein für den Austausch einzelner Aminosäuren, um die Interaktion von MTG mit einem Glutaminendonorprotein intensiver zu charakterisieren.

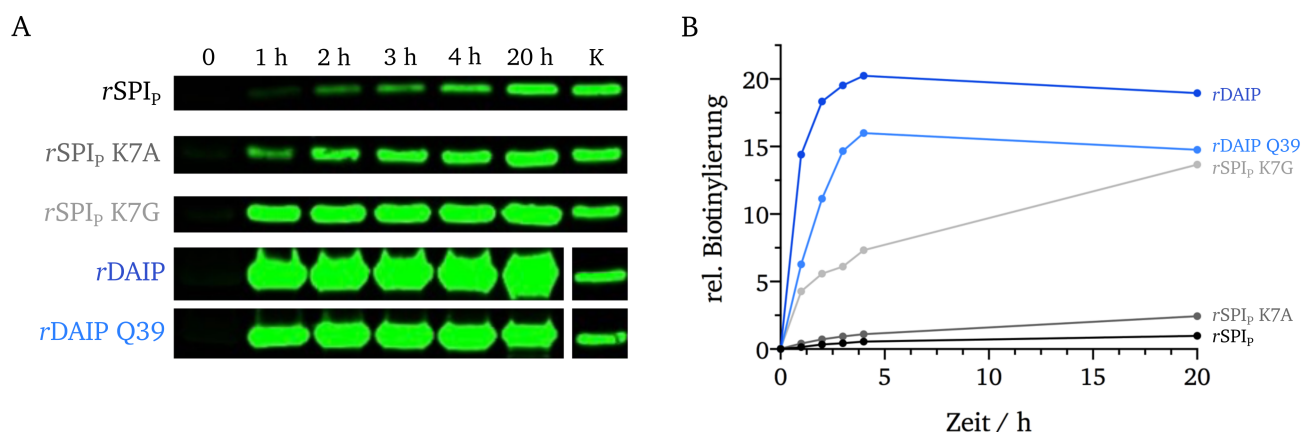


Abbildung 51: MTG-vermittelte Biotinylierung von rSPI_p-Varianten im Vergleich mit rDAIP [157].

Die Protein-Varianten (15 µM) wurden mit Monobiotinylcadaverin (200 µM) und MTG (0.3 µM) bei 37 °C für die angegebenen Zeiträume in 50 mM Tris HCl pH 8.0 mit 100 mM NaCl inkubiert. Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung und Protein-*Blotting* wurden die Proteine mit einem IRDye-800-CW-Streptavidin-Konjugat (Licor) visualisiert. rSPI_p nach 20 h Inkubation stellte die Positivkontrolle dar. A) Proteinblots unterschiedlicher Markierungen zu den angegebenen Zeiträumen. B) Relativer Biotinylierungsgrad der angegebenen Proteinvarianten.

Wie zuvor beschrieben, stellt nur das Gln6 des SPI_p eine MTG-Substratbindestelle dar. Gln6 befindet sich im N-terminalen Peptid des SPI_p. Der untere Bereich der „vorderen“ MTG-Scheibe, die wegen der Cys64-Thiolatorientierung als Bindestelle für Glutamin-Donorproteine betrachtet wird [50], ist hauptsächlich hydrophob mit einzelnen schwach positiven Ladungen (Tyr62, Val65, Trp69, Tyr75, Pro76, Thr77 und Phe254) besetzt (vergl. Abbildung 7). Blickt man direkt auf diese Enzymfläche, so befinden sich links vom katalytischen Spalt vornehmlich Aminosäuren mit negativer Ladung (Asp1, Asp3, Asp4, Glu54, Glu55, Glu58) und rechts Aminosäuren mit positiver Ladung (Arg208, Arg215, Arg238). Die hydrophoben Reste in der Nähe des SPI_p-Gln6 könnten daher mit den ungeladenen Aminosäuren unterhalb des katalytischen Spalts interagieren, um SPI_p-Gln6 zu MTG-Cys64 auszurichten [82]. Trotz der kleinen und hydrophoben Reste jenseits des SPI_p-Gln6 erwies sich die Effizienz der SPI_p-Markierung im Vergleich mit DAIP als gering. Als mögliches Störobjekt für die Proteininteraktion wurde die basische Aminosäure Lys7 betrachtet [166].

Um diese Hypothese zu testen und den Einfluss von Resten, die Gln6 flankieren, weiter zu analysieren, wurde Lys7 durch Glycin, Alanin und Aspartat ersetzt. Die erhaltenen Varianten wurden durch enzymatische Biotinylierung charakterisiert (Tabelle 17, Abbildung 52). Für die strukturelle Integrität der Varianten war es wichtig, dass sie jeweils alle drei strukturstabilisierenden Glutamine enthielten und der Schmelzpunkt durch die K7-Substitutionen nur um weniger als 2 °C reduziert wurde (Tabelle 17). Während der Austausch von Lys7 durch Aspartat zu einer Verringerung der Markierungseffizienz führte, erhöhte der Austausch gegen Glycin (Lys7Gly) den MTG-vermittelten Amin-Einbau beträchtlich (> 13-fach), was frühere Ergebnisse und Beobachtungen unterstützt [50, 82, 166]. Selbst Alanin in Lys7Ala wirkte sich positiv auf die Biotinylierungsreaktion durch MTG aus. Die Lys7Gly-Variante zeigte jedoch im Bezug auf die Lys7Ala-Variante eine 5- bis 6-fach höhere Markierungseffizienz, was höchst

wahrscheinlich auf die Methylgruppe am Alanin-C_α zurückzuführen ist. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen scheint das Vorkommen von kleinen und hydrophoben Aminosäuren um eine Glutamin-Bindestelle eine notwendige Voraussetzung für die Interaktion und effiziente Modifikation durch MTG zu sein, zumindest für starre Acyldonorproteine mit begrenzter Zugänglichkeit wie bei SPI_p. Eine geladene Aminosäure wie Lysin oder Aspartat in direkter Nachbarschaft beeinträchtigt die Bindung von MTG an die Glutamindonorregion (Tabelle 17).

Um den Einfluss von Regionen außerhalb der Glutamin-Donorregion besser zu verstehen, erfolgte eine eingehendere Charakterisierung der Oberfläche des SPI_p. Neben der Bildung geladener, komplementärer *Patches*, die enge, benachbarte Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen fördern, beeinflussen auch geladene Reste auf der Oberfläche durch "elektrostatische Lenkung" die Wechselwirkung des anfänglichen Bindungsereignisses zweier Moleküle in größerer Entfernung. Daher kann ein detailliertes Verständnis des Einflusses von geladenen Oberflächenresten auf die Wechselwirkungen zwischen MTG und seinem physiologischen Substrat SPI_p dazu beitragen, die physiologische Funktion der Substratproteine besser zu verstehen.

Die Substrateigenschaften des SPI_p, wie die spezifische Markierung des Gln6, ermöglichten die Durchführung eines bioinformatischen Protein-Protein-*Dockings* mit Hilfe des ClusPro-Servers des *Structural Bioinformatics* Labor der Universität Boston [167-171]. Das Docking mit der MTG (PDB: 1IU4, [50]) erfolgte mit einer durch den Phyre2-Server [172] generierten theoretischen Struktur des SPI_p, da die Kristallstruktur des SPI_p zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt war (Abbildung 48). Bei Vergleich mit der später generierten Kristallstruktur wies die errechnete SPI_p-Struktur mit einer mittleren quadratischen Abweichung von 1.521 Å, nur verhältnismäße geringe Abweichungen auf. Das Docking beider Strukturen ergab mehrere mögliche Orientierungen des SPI_p bei Bindung an die Transglutaminase. Die Interaktion beider Proteine mit dem geringsten Abstand (6.813 Å) des SPI_p-Gln6 zum katalytischen Cys64 der MTG ist in Abbildung 52 illustriert. Das *Docking* basierte vornehmlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen beiden Proteinen und identifizierte potentielle Interaktionsflächen zwischen SPI_p und der MTG. Die markantesten Wechselwirkungen herrschten zwischen den Arg68 und Arg110 des SPI_p und Glu54, Glu55 und Glu58 der MTG. Weitere signifikante Kontakte wurden zwischen dem Lys92 des SPI_p und dem Glu182 der MTG sowie zwischen dem Asp97 und dem Arg175 durch das *Docking* angezeigt. Um die hypothetische Interaktion näher zu charakterisieren, erfolgte eine Ladungsumkehr durch punktuellen Austausch der betreffenden Aminosäuren im SPI_p. Die betreffenden basischen Aminosäuren wurden gegen Glutamate ausgetauscht und Asp97 durch Arg ersetzt. Zusätzlich wurden innerhalb der potentiellen Interaktionsfläche die basischen Aminosäuren Arg65 und Lys107 des SPI_p durch Glutaminsäure ersetzt, um die Auswirkungen der Ladungsumkehr zu detektieren (Abbildung 52). Es wurde vermutet, dass die durch

den jeweiligen AS-Austausch eingeführte Ladungsänderung zu einer Störung der Interaktion zwischen SPI_p und MTG und somit zu einer geringeren Biotinylierung der Varianten führt.

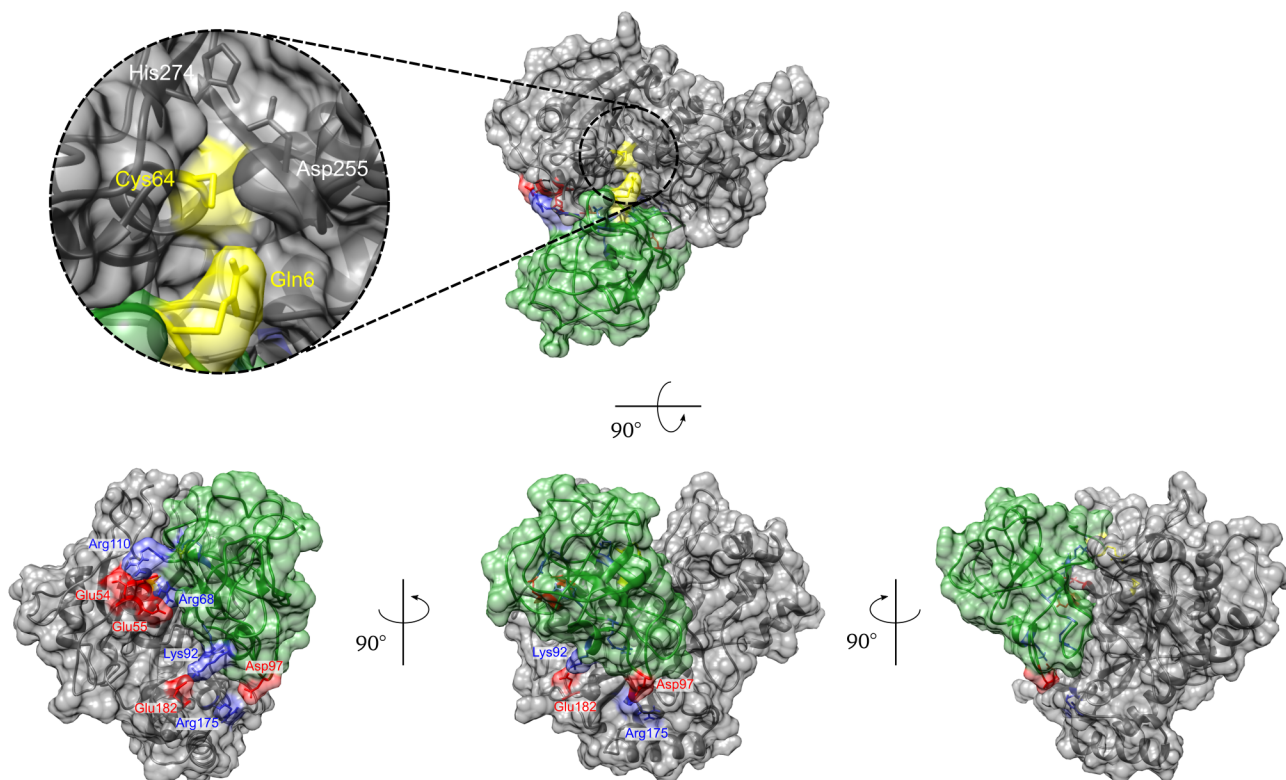


Abbildung 52: Protein-Protein-Docking der Transglutaminase mit dem Homologie-Modell des SPI_p.

Das *Docking* wurde auf dem ClusPro-Server des *Structural Bioinformatics* Labors der Universität Boston durchgeführt [167-171]. Als Grundlage wurden die Transglutaminasestruktur des PDB-Eintrags 1IU4 und der durch den PHYRE²-Server [172] modellierte SPI_p verwendet. Der SPI_p ist in grün, die Transglutaminase in grau dargestellt. Die hypothetische Bindung beider Proteine miteinander wurde von verschiedenen seitlichen Perspektiven, sowie von oben gezeigt. Die Orientierung und Position des Gln6 des SPI_p zum Cys64 der Transglutaminase ist in gelb hervorgehoben. Basische AS an der Grenzfläche sind blau markiert und saure AS in rot.

Die rekombinante Produktion und vergleichende Biotinylierung zeigte jedoch, dass alle generierten Varianten eine erhöhte Biotinylierung von ca. 1.21 bis 2.90 aufwiesen (Tabelle 17). Die Ladungsumkehr führte dem entsprechend zu einer Verbesserung der Substrateigenschaften des SPI_p und nicht, wie zu erwarten gewesen wäre, zu einer verschlechterten Interaktion zwischen Substrat und Enzym. Die auf Basis des *Docking*-Ergebnisses durchgeführten Experimente zeigten die Grenzen der *Docking*-Simulation auf. Vermutlich ist die Unzuverlässigkeit der Simulation der Protein-Protein-Interaktionen auf die konformationelle Flexibilität beider Interaktionspartner und ihre besondere Fähigkeit zur gegenseitigen strukturellen Anpassung zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde auf weitere *Docking*-Experimente verzichtet und stattdessen die Kokristallisation von MTG und SPI_p initiiert. Jedoch gelang die Kristallisation des binären MTG-SPI_p-Komplexes am HZI in Braunschweig nicht, wahrscheinlich wegen der hohen Instabilität des durch den MTG-Cys64-Thiolat-Angriff auf das SPI_p-Gln6-γ-Carboxamid erzeugten Thioester-Intermediats. Um weiterführend den Einfluss von Oberflächenresten außerhalb der Region um das Gln6 auf die Ausrichtung des Glutaminrestes zum

aktiven Zentrum der MTG zu analysieren, wurden mehrere wasserexponierte, ungeladene Aminosäuren an der Oberfläche des SPI_p durch Arginin- und Glutamat/Aspartat-Reste ausgetauscht. Für die Auswahl wurde die wtSPI_p-Struktur herangezogen, um eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Molekül zu erreichen (Tabelle 17, Abbildung 48, Abbildung 53). Es erfolgte immer nur eine Punktmutation pro Variante, um die Struktur des SPI_p nicht übermäßig zu beeinflussen.

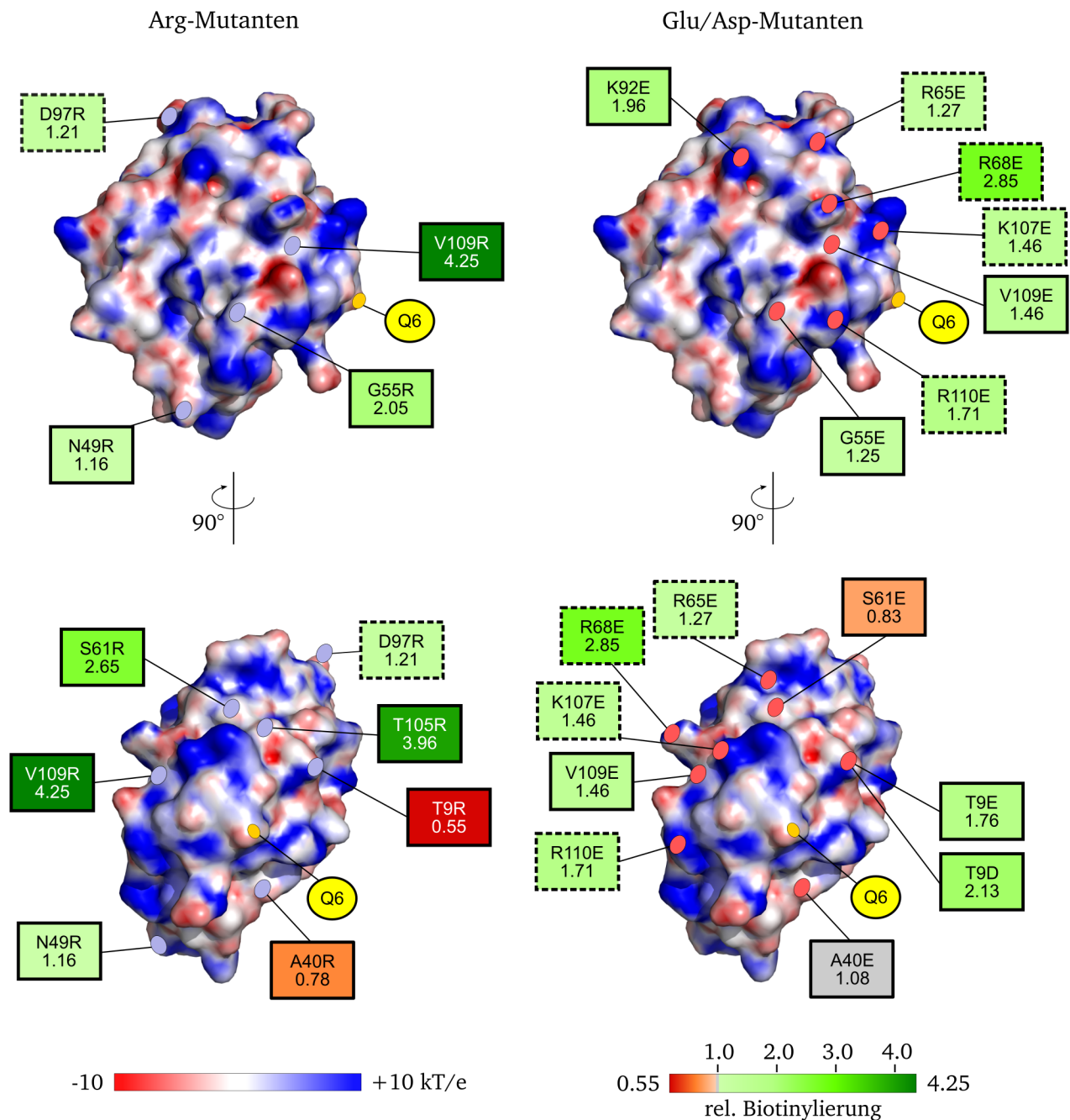


Abbildung 53: Zusammenfassung der Mutagenese studie des SPI_p [157].

Die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren mit der relativen Biotinylierungsintensität (vergl. Tabelle 17) im Vergleich zum rSPI_p sind auf der elektrostatischen Oberfläche des rSPI_p (-10 bis +10 kT/e) angegeben. Der Austausch zu Arginin ist auf der linken Seite, die Glu/Asp-Varianten auf der rechten Seite dargestellt. Zusätzlich ist die relative Markierbarkeit des SPI_p durch MTG von rot (Reduktion) über grau (kein Effekt) nach grün (Erhöhung) koloriert. Varianten, bei denen ungeladenen AS durch geladene ersetzt wurden, sind mit einer durchgezogenen Line umrandet.

Wie bei vorrangegangenen Untersuchungen enthielten alle Varianten die stabilisierenden Glutamine und zeigten identisch zum *wtSPI_p* vergleichbare Schmelzpunkte. Daraus wurde abgeleitet, dass die eingeführten Mutationen keinen wesentlichen Einfluss auf die Strukturintegrität hatten. Sieben Reste wurden durch Arginin substituiert und fünf durch Glutamat oder Aspartat (Tabelle 17). Von den Arginin-Varianten zeigten R49 (Asn49Arg), R55 (Gly55Arg), R61 (Ser61Arg), R105 (Thr105Arg) und R109 (Val109Arg) trotz der Anwesenheit von Lys7 eine deutlich höhere (ca. 1.2- bis 4.2-fache) Amin-Einbaurate als *rSPI_p*. R9 (Thr9Arg) führte zu einer Reduktion des Amin-Einbaus um ca. 45%. Die Einführung der entgegengesetzten Ladung hatte jedoch nur bei E61 (Ser61Glu) und E9/D9 (Thr9Glu/Asp) den erwarteten Umkehreffekt, also eine leichte Reduzierung des Amin-Einbaus für E61 (0.83) und eine erhöhte Markierungseffizienz für E9 und D9 (1.76 bzw. 2.13). Der Austausch in den Positionen Gly55 und Val109 führte unabhängig von der Ladung zu einer erhöhten Amin-Inkorporationseffizienz, wenn auch die Steigerung durch Einführung einer sauren Aminosäure in einem geringeren Ausmaß (1.25 - 1.46) gegenüber den basischen Varianten (2.05 - 4.25) beträchtlich geringer ausfiel. Weiterhin zeigte eine Mutation von Ala40, dass diese Position für die Interaktion von MTG mit *SPI_p* keine Rolle spielt. Lediglich Thr9 und Ser61 wiesen darauf hin, dass Oberflächenbereiche in dieser Region die Wechselwirkung von *rSPI_p* mit MTG fördern könnten. Für die anderen drei Positionen (Gly55, Ser61 und Val109) scheinen komplementäre Ladungen für die Annäherung beider Proteine unerheblich zu sein. Ihre Funktion kann auf Grundlage der aktuellen Ergebnisse und des derzeitigen Wissens über die Strukturen und die Eigenschaften von MTG und *rSPI_p* nicht erklärt werden.

3.4.7. Interaktion der MTG mit Inhibitorpeptiden abgeleitet aus MTG-Substratproteinen

Die bisher durchgeführten Studien der Interaktion von MTG und *SPI_p* legen nahe, dass mehrere Aminosäuren für die Anziehung und Interaktion zwischen MTG und *SPI_p* wichtig sein könnten, waren jedoch hinsichtlich der Protein-Protein-Interaktion nicht schlüssig. Um Substratbindungsmotive der MTG im Bereich des aktiven Zentrums zu identifizieren, wurden Substrat-Inhibitorpeptide synthetisiert. Diese wurden von nativen Substratproteinen mit bekannter Struktur, nämlich DAIP (Gln39) und *SPI_p* (Gln6), und deren Glutamin-flankierenden Aminosäuresequenzen abgeleitet (Tabelle 18). Diese Peptide wurden für die Beschreibung der Affinität über ihre Inhibitorkinetik sowie die strukturelle Aufklärung der Lage eines gebundenen Substratpeptides im aktiven Zentrum der MTG verwendet.

Tabelle 18: Glutamine-flankierende Sequenzen der intrinsischen MTG-Substrate DAIP und SPI_p.

Glutamine	Sequenz ¹	MTG-Bindungsstärke ²	Inhibitorpeptid
DAIP-Q39	TTGTLQSVSYT	stark	IP1
DAIP-Q65	HNDELQRSTDA	keine	-
DAIP-Q144	AGSDGQLYDST	keine	-
DAIP-Q298	YGTIFYQAYGTD	schwach	-
DAIP-Q345	GLEEVQIHH	schwach	-
SPI-Q6	DIPIGQKMTGK	schwach	IP2
SPI-Q6-K7G	DIPIGQGMTGK	stark	IP3
SPI-Q32	IDASSQDLVAI	keine	-
SPI-Q87	HIDLSQAFAK	keine	-

¹ Sequenzen, die zur Ableitung der Inhibitorpeptide genutzt wurden sind grau markiert. ² Quelle für die Bindungsstärke: DAIP-Varianten Fiebig *et al.*, 2016 [82], für die SPI_p-Varianten Tabelle 17.

Die inhibitorischen Peptide für die mikrobielle Transglutaminase (MTG) wurden unter Verwendung von Fmoc/Boc-basierter Festphasen-Peptidsynthese an einem Trägerharz bei Prof. Kolmar hergestellt. Zwei Peptide wurden von Sequenzmotiven des DAIP (Gln39, 9 AS langes Peptid) und des SPI_p (Gln6, 10 AS langes Peptid) abgeleitet. Diese werden im folgenden als inhibitorische Peptide IP1 und IP2 bezeichnet (Tabelle 18, grau hervorgehoben). Der Austausch des SPI-Lys7 gegen Glycin, der die MTG-vermittelte Biotinylierung vervielfachte (Tabelle 17), führte zu einem dritten 10-AS-langen Inhibitorpeptid (IP3). Die Glutamine wurden durch Serine ersetzt, um Vorläuferpeptide für die Einführung der reaktiven Inhibierungsgruppe zu erhalten. Die Reaktion der geschützten Vorläufermoleküle mit Chloressigsäureanhydrid erzeugte gleichzeitig den erforderlichen *Spacer* und die elektrophile reaktive Gruppe, die die irreversible Alkylierung des katalytisch-aktiven MTG-Cysteins ermöglichte (Abbildung 54).

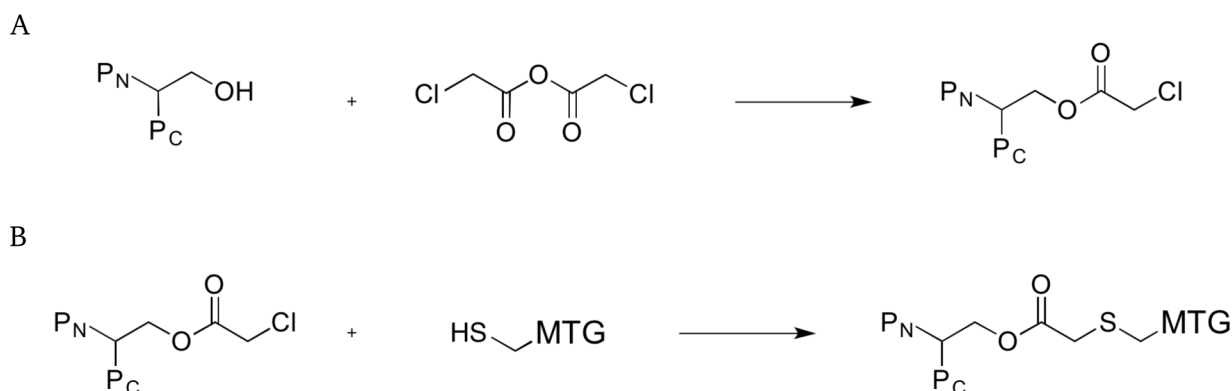


Abbildung 54: Hemmung der mikrobiellen Transglutaminase durch chloracetylierte Serinpeptide [173].

A) Einführung der reaktiven Gruppe in die Serin-enthaltenden Peptide. B) Irreversible Hemmung von MTG durch Thioetherbildung mit dem katalytischen Cysteinrest im aktiven Zentrum der MTG. P_N und P_C sind die glutaminflankierenden Peptidenden.

Die Effizienz der inhibitorischen Peptide wurde durch MTG-vermittelten Einbau von Monodansylcadaverin (MDC) in Dimethylcasein untersucht. Die alkylierten Casein-Lysine verhindern dabei die Bildung von Aggregaten mit hohem Molekulargewicht, während die enzymatische

Konjugation mit MDC die Fluoreszenzintensität des Aminonaphthalinsulfonamidderivats verstärkt [116]. Der Assay ermöglicht kontinuierliche Messungen, ist jedoch durch das Auftreten mehrerer reaktiver Glutamine in Dimethylcasein eingeschränkt, wobei MDC in verschiedenen hydrophoben Umgebungen vorliegt und somit einen unterschiedlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität erzeugt. Die Linearität des Assays war jedoch unter den verwendeten Bedingungen innerhalb der ersten zehn Minuten gegeben (Abbildung 55A).

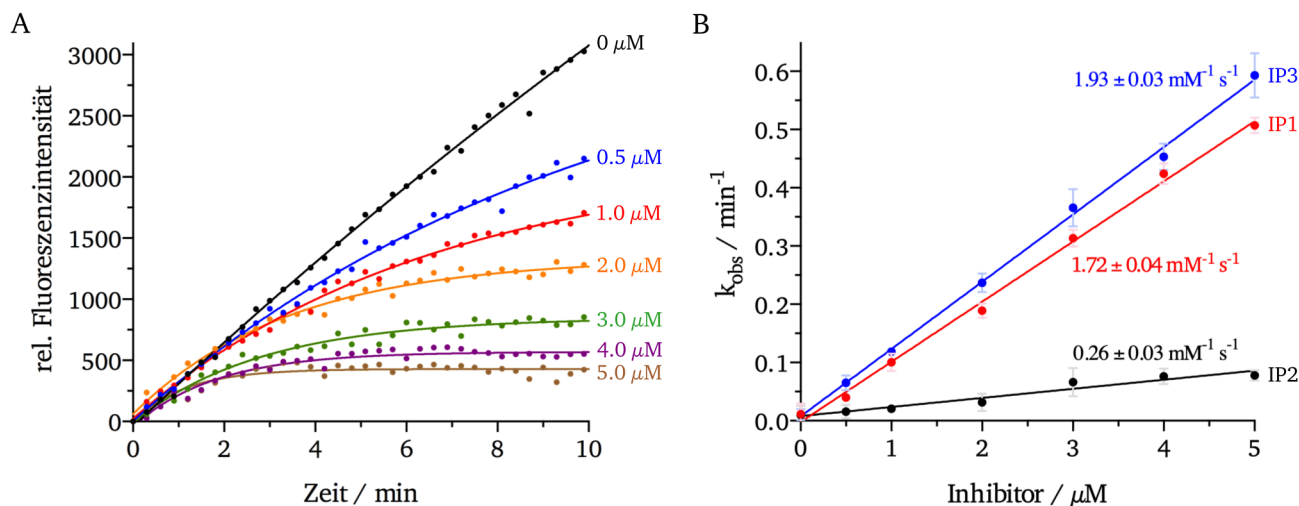


Abbildung 55: Kinetik der Transglutaminase-Hemmung durch IP1, IP2 und IP3 [173].

A) Beispielhafte Konjugation von 25 μM Monodansylcadaverin und 20 μM Dimethylcasein mit 25 nM MTG bei pH 8.0 in Gegenwart kompetitiver Mengen an IP1. Die Daten wurden mit GraphPad Prism (Ein-Phasen-Assoziation) ausgewertet. B) Effizienz der inhibitorischen Peptide IP1, IP2 und IP3, ($k_{\text{obs}}/[I]$) mit Angabe der zugehörigen Standardabweichung (SD) in Dreifachbestimmung.

Unter Verwendung des DCC-Assays erfolgte eine signifikante Inhibierung der MTG durch die verwendeten Inhibitorpeptide ab Konzentrationen größer 500 nM. Eine vollständige Hemmung der MTG-Aktivität wurde durch die Zugabe von 3 - 5 μM Inhibitor während der gewählten Zeitspanne von 10 min erreicht. Dieser kompetitive Inhibierungs-Assay führte zu einer nichtlinearen Verringerung der Zunahme des Fluoreszenzsignals, welches einen Plateau-Wert (stationäre Umsatzrate des Enzyms von Null) erreichte, wie für irreversibel wirkende Moleküle erwartet werden kann.

Die spezifische Inaktivierung von Enzymen wird häufig durch zweistufige Mechanismen gesteuert. Dieser Mechanismus umfasst im ersten Schritt (I) die reversible Komplexbildung des wirksamen Moleküls mit dem Enzym und im zweiten Schritt (II) die kovalente Inaktivierungsreaktion. Bei diesem zweistufigen Reaktionsablauf wird die Wirksamkeit der Inhibierung durch die Geschwindigkeitskonstante k_{inact}/K_I beschrieben, wobei K_I die Inhibitor-Konzentration bei halbmaximaler Inhibitionsrate und k_{inact} die Inaktivierungsrate bei Enzymsättigung (100%ige Belegung des Enzyms mit dem inhibitorischen Molekül) darstellt [174]. Die lineare Abhängigkeit zwischen der Inaktivierungsrate, definiert durch k_{obs} einer pseudo-ersten Ordnungsreaktion und der Inhibitor-Konzentration, legt jedoch eine nicht-spezifische Hemmung der MTG durch die inhibitorischen Peptide

nahe. In diesem Fall reagierte das chloracetylierte Serinpeptid nicht nur mit dem Cystein im aktiven Zentrum der MTG und k_{obs} erscheint nicht-sättigend. Die Effizienz der inhibitorischen Peptide wird entsprechend durch die Steigung der Geraden ausgedrückt, $k_{\text{obs}}/[I]$ bzw. k_{inact}/K_i (Abbildung 55B). IP2 und IP3 zeigten ein vergleichbares Inhibierungsverhalten wie IP1, wobei IP2 den schwächsten Inhibitor für die MTG darstellt. Wie erwartet sind IP1 und IP3 deutlich effektivere Inhibitor der MTG. Für IP1 wurde eine inhibitorische Effizienz ($k_{\text{obs}}/[I]$) von $1.72 \pm 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, für IP2 von $0.26 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und für IP3 von $1.93 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt.

Zur Kristallisation durch Dr. Schmelz und Dr. Scrima am HZI wurde gereinigte Transglutaminase aus Kulturüberständen von *S. mobaraensis* mit einem 5-fachen molaren Überschuss der inhibitorischen Moleküle IP1 - IP3 bei pH 6.0 inaktiviert. In Zentrifugationskonzentratoren erfolgte ein dreimaliger Pufferwechsel, um nicht umgesetzte Peptide zu entfernen. Alle kovalent inhibierten Transglutaminase-Konjugate kristallisierten unter ähnlichen Bedingungen wie das aktive Enzym [50] in der Raumgruppe $P2_1$, enthielten aber zwei anstelle von vier Molekülen je asymmetrischer Einheit. Die Auflösung der Komplexe reichte von 2.0 Å (IP1) bis 2.8 Å (IP3) und ermöglichte die Modellierung der MTG-Struktur, jedoch war die Elektronendichte der inhibitorischen Peptide IP1 und IP3 nicht interpretierbar, was auf mehrere Bindungsmodi hindeutete. Der mit IP2 (DIPIGS*KMTG-NH₂, 2.25 Å Auflösung) gebildete Komplex ermöglichte jedoch die Bestimmung des kovalent gebundenen inhibitorischen Peptids zwischen den Aminosäuren Asp1 bis Met8 in einem und Asp1 bis Thr9 in dem anderen Komplex der asymmetrischen Einheit (Tabelle 18, Abbildung 56A, B). Trotz geringfügiger Unterschiede in den Rückgrat- und Seitenkettenkonformationen war der Gesamtbindungsmodus in beiden Komplexen sehr ähnlich (Abbildung 56C). Daher beschränkt sich die Beschreibung der Komplexstruktur auf einen der beiden Komplexe und konzentriert sich auf Wechselwirkungen, die in beiden MTG-IP2-Komplexen beobachtet werden konnten (Dr. Scrima, Dr. Schmelz).

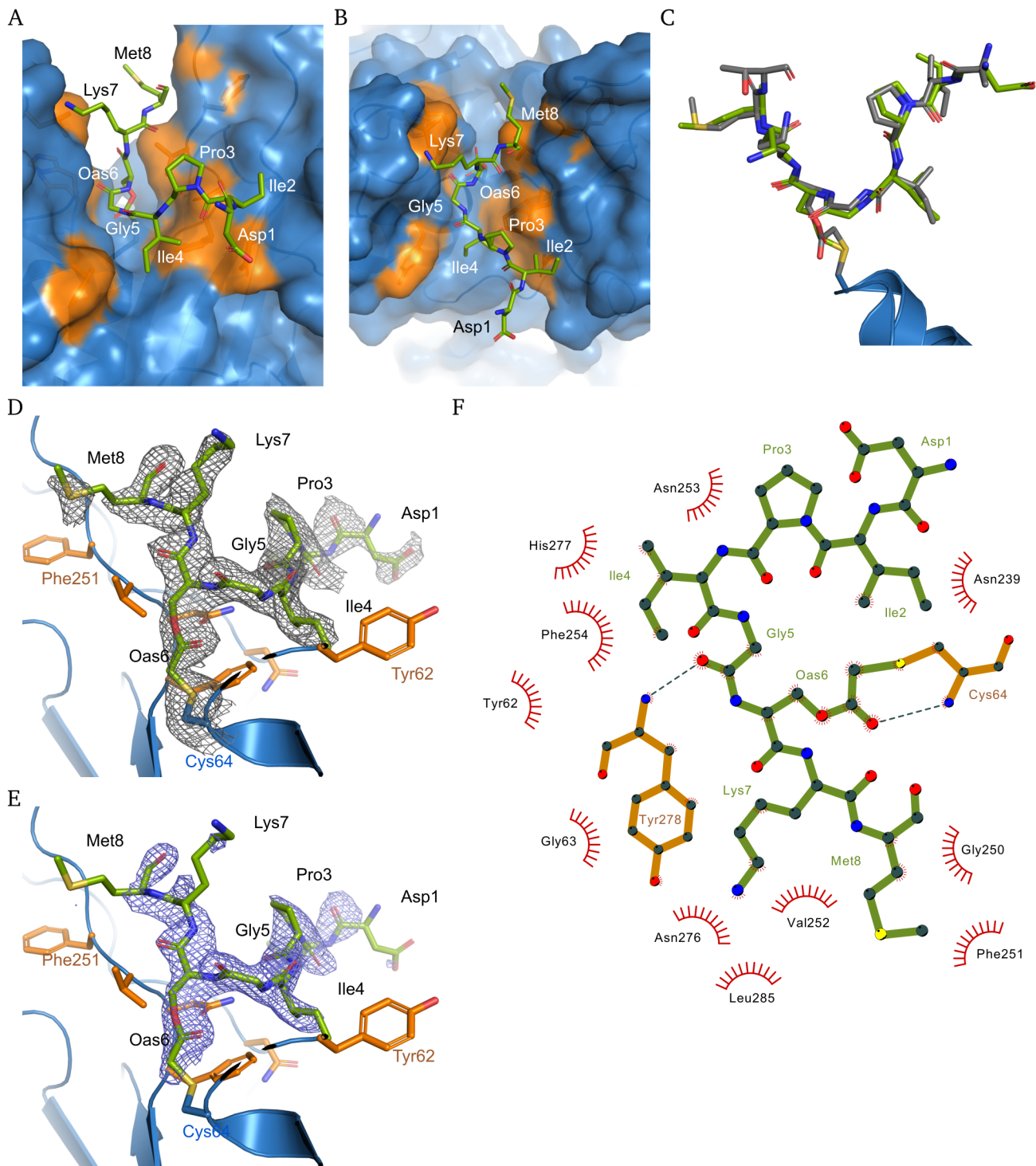


Abbildung 56: Kristallstruktur von DIPIGS-(COCH₂Cl)-KMTG-NH₂ (IP2) kovalent an MTG gebunden [173].

A) Vorderseite (Glutamin-Donorstelle) und B) Draufsicht mit hydrophoben Oberflächenbereichen der MTG in orange, die mit IP2 (grün in Strichdarstellung) interagieren. C) Überlagerung der Ketten C (grün) und D (grau) des kovalent gebundenen IP2. D) und E) 2F_oF_c und F_oF_c Elektronendichtekarte von IP2 bei 0.9 σ und 2.8 σ . Reste, die mit IP2 interagieren, sind in Stabdarstellung mit orange gefärbten Kohlenstoffatomen gezeigt. F) Protein-IP2-Wechselwirkung analysiert durch Ligplot+ [154]. IP2-Reste sind grün dargestellt, gestrichelte Linien kennzeichnen Wasserstoffbrücken, Bögen mit Speichen, die zu IP2-Atomen abstrahlen, stellen hydrophobe Kontakte dar.

Die MTG-IP2-Komplexstruktur zeigte das Auftreten der Thioetherbindung, die für den nukleophilen Angriff des MTG-Cysteinthiolats auf die chloracetylierte β -Hydroxygruppe des IP2-Ser6 (O-acyliertes

Serin, OAS) zu erwarten war (Abbildung 54). Der Carboxylsauerstoff der IP2-Ser6-Esterbindung wechselwirkt mit dem Amidstickstoff des MTG-Cys64-Rückgrats (Abbildung 56D-F). Die gesamte Interaktionsfläche umfasste ca. 500 Å², und die Wechselwirkung war hauptsächlich auf sechs Reste des inhibitorischen Peptids beschränkt, nämlich Ile2 und Ile4 bis Met8, was die schwächere Elektronendichte außerhalb dieser Region des Peptids aufgrund einer höheren Flexibilität erklärt (Abbildung 56D, E). Obwohl Wassermoleküle in der komplexen Struktur vorhanden waren, die wahrscheinlich zur Wechselwirkung zwischen Peptid und MTG beitragen, wird die Diskussion auf Wechselwirkungen zwischen MTG- und IP2-Resten beschränkt, da die begrenzte Auflösung und Qualität der Elektronendichte eine detaillierte und zuverlässige Beschreibung von Wasser-vermittelten Kontakten kaum ermöglichte. Abgesehen von einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Carboxylsauerstoff des IP2-Gly5-Rückgrats und dem MTG-Tyr278-Amidstickstoffs sowie der kovalenten Thioetherbindung zwischen IP2-OAS (Ser6) und MTG-Cys64 ist der Großteil der Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und der MTG hydrophober Natur (Abbildung 56F).

Die hydrophoben Wechselwirkungen wurden durch den hydrophoben Teil von insgesamt elf Aminosäureresten der MTG vermittelt, die an den beiden Spaltwänden des aktiven Zentrums (Tyr62, Gly63, Asn239, Gly250, Phe251, Val252, Asn253, Phe254, Asn276, His277, Leu285) gehäuft vorliegen. Demzufolge beschränkt sich die Wechselwirkung des Peptids auf Aminosäuren, die die Spaltwände formen, und schließt Wechselwirkungen mit Aminosäureresten im vorderen Vestibül der MTG (der vorgeschlagenen Bindestelle von Glutamin-Substraten [50]) aus. Die Reste Ile4 und Gly5 des IP2 besetzen mit dem kovalent gebundenen OAS den engen und hauptsächlich hydrophoben Spaltboden in Längsrichtung (Abbildung 56A, B). Von diesem Peptidzentrum (⁴IGS⁶) aus ragen dessen N- und C-terminale Enden entlang der Spaltwände fast senkrecht aus dem Spaltboden. Dabei sind sowohl der N- als auch der C-Terminus des Peptids zur Seite des vorderen Vestibüls ausgerichtet (Abbildung 56A-C).

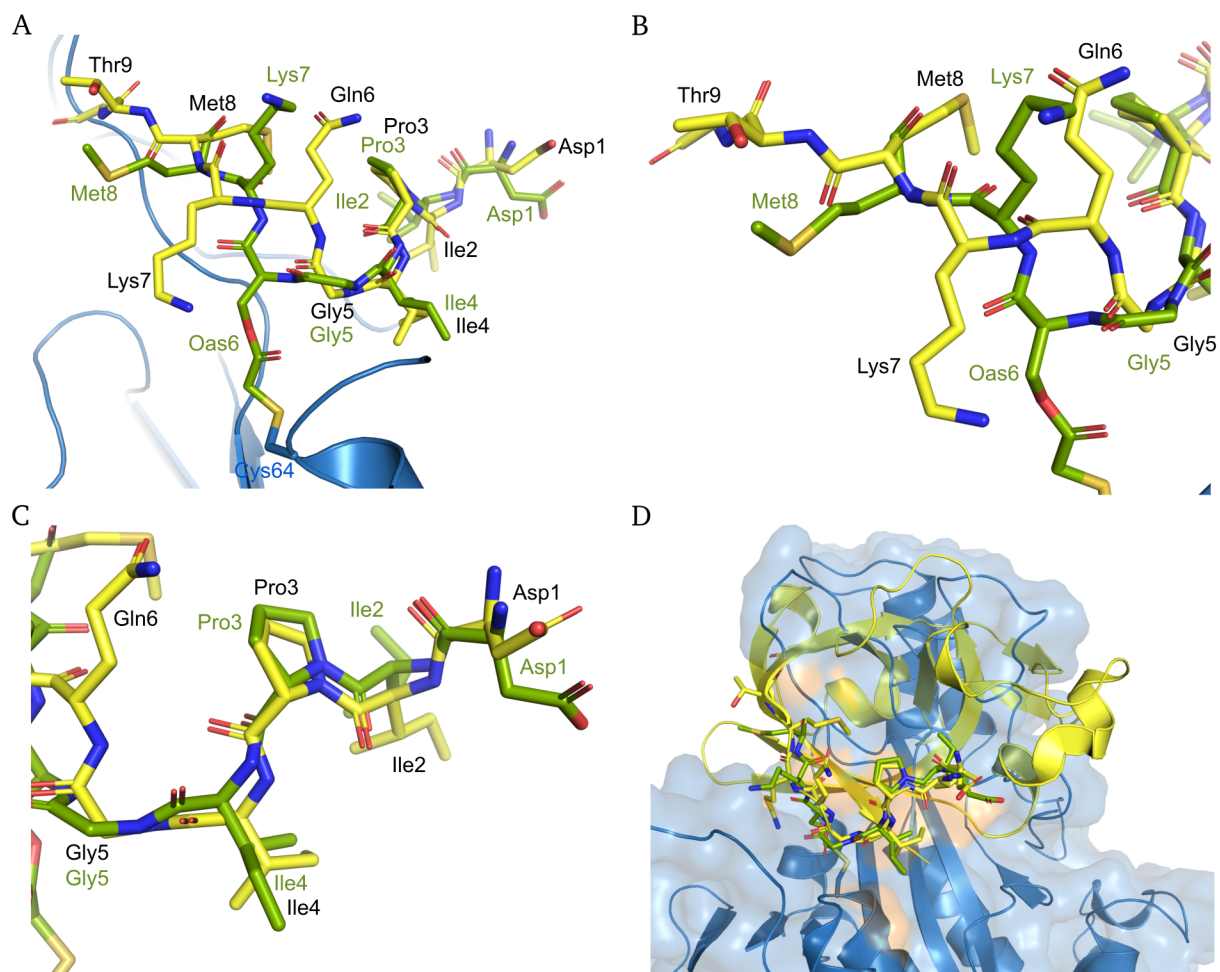


Abbildung 57: Analyse der N-terminalen Region von SPI_p auf Grundlage des an MTG gebundenem IP2 [173].

A) Überlagerung der IP2-Aminosäurereste (DIPIGS(COCH₂Cl)KMT) mit den N-terminalen Aminosäuren von SPI_p (DIPIGQKMT). IP2- und SPI_p-Aminosäurereste sind grün bzw. gelb gefärbt. B) und C) Nahansicht der Ausrichtung aus Abbildung A). Man beachte die nahezu perfekte Anordnung der Reste D1-G5. D) Überlagerung des Volllängen-SPI_p mit dem IP2-MTG-Komplex. Die Ausrichtung basiert auf den IP2-Resten, wie in A) - C) gezeigt. SPI_p (gelber Cartoon-Modus) kollidiert mit MTG (blauer Cartoon-Modus mit transparenter Oberfläche).

Interessanterweise zeigte die Überlagerung der Peptidstruktur mit der SPI_p-Struktur Unterschiede in der Orientierung der Aminosäureseitenketten, wobei das gesamte Rückgrat von IP2 ähnlich zu der des N-Terminus des SPI_p liegt (Abbildung 57). Zum einen ist das acylierte Ser6 des IP2 (OAS) im SPI_p um nahezu 180 Grad gegenüber dem Substrat-Glutamin gedreht. Darüber hinaus nehmen die Reste Lys7 und Met8, die sich auf der Carboxy-Seite der IP2-reaktiven Gruppe befinden, eine andere Konformation als in der SPI_p-Struktur ein (Abbildung 57A - C). Dies resultiert wahrscheinlich aus einer Rotation von IP2-OAS zur Ausbildung der kovalenten Bindung mit dem Thiolat von MTG-Cys64. Außerdem nimmt die Seitenkette des Lys7, die die Biotinylierung des SPI_p-Glutamins (Tabelle 17) stört, im Inhibitorpeptid eine völlig andere Stellung als im SPI-Protein ein. Die Lys7 Seitenkette von IP2 dreht sich um ca. 108 Grad zur MTG-Spaltöffnung, während Lys7 in SPI_p den Spaltboden der MTG durchdringen müsste (Abbildung 56A, B). Schließlich verdreht die MTG-Spaltwand Met8 in IP2 um ca. 180 Grad so, dass die Seitenkette zum hinteren Vestibül (Lysindonor-Bindungsstelle) ausgerichtet ist.

Dabei wechselwirkt sie mit einem hydrophoben Feld, das durch die Aminosäuren MTG-²⁵⁰GlyPheVal²⁵² gebildet wird (Abbildung 56D - F). Bemerkenswert ist jedoch, dass die DPBB-Domäne des SPI_p bei der Überlagerung mit der MTG-Struktur kollidiert (Abbildung 57D, Abbildung 58A, B), was zu der Vermutung Anlass gibt, dass abgesehen von den lokalen Konformationsänderungen in der IP2-⁶SerLysMet⁸-Sequenz wahrscheinlich eine Ablösung des N-terminalen Peptids von der DPBB-Kerndomäne erfolgt, damit überhaupt eine Modifikation von SPI_p durch MTG möglich wird (Abbildung 58C, D).

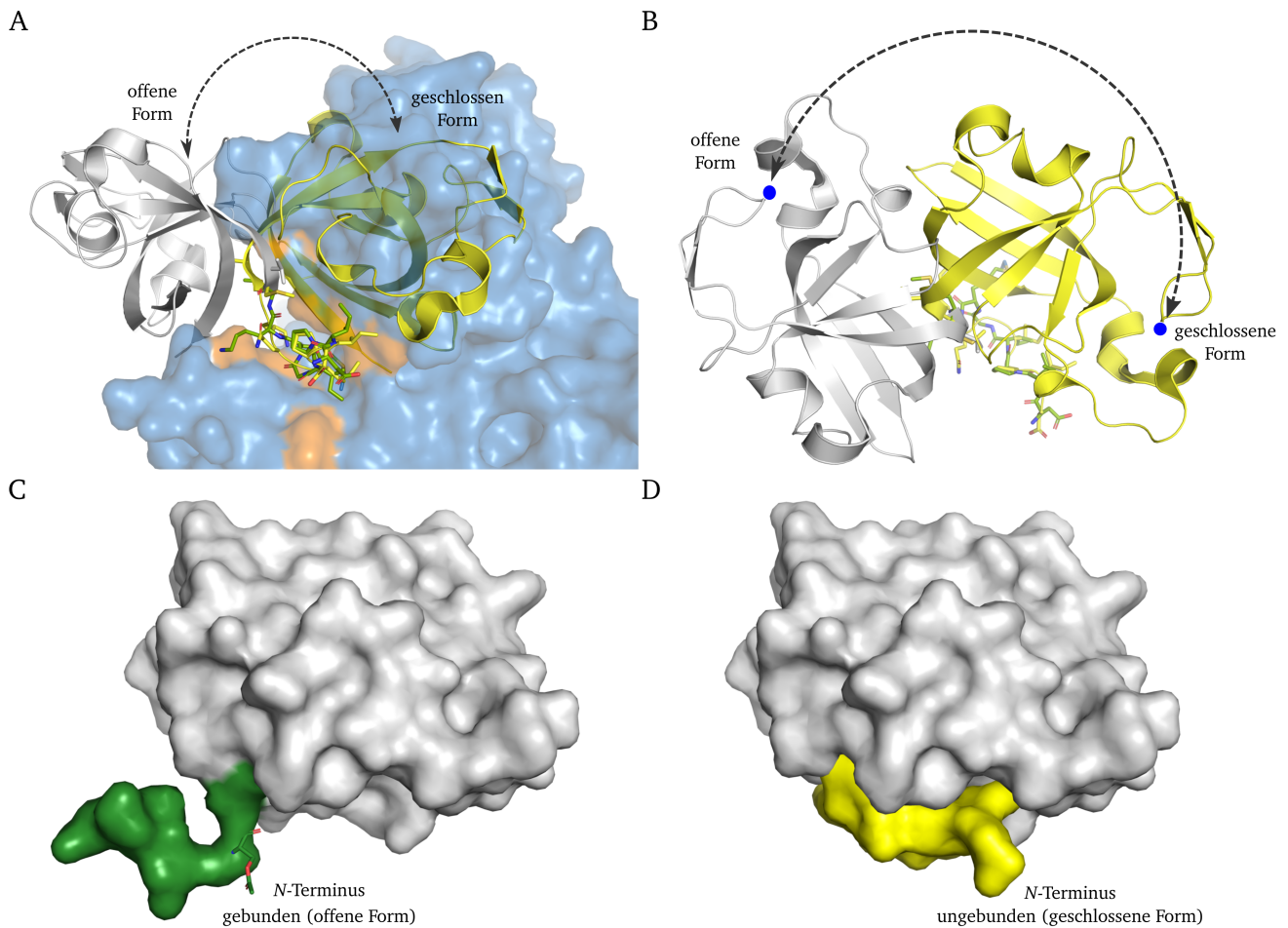


Abbildung 58: Modell eines potentiellen SPI_p-MTG-Komplexes [173].

A) und B) Überlagerung der "geschlossenen" und hypothetischen "offenen" Form von SPI_p mit und ohne MTG (farbig wie in Abbildung 57). Die Ausrichtung der "geschlossenen" Form von SPI_p (gelber Cartoon) basiert auf der Ausrichtung des IP2, wie in Abbildung 56D gezeigt. Die geschlossene Form von SPI_p (gelb, Cartoon) kollidiert mit MTG bei Ausbildung des Acyl-Enzym-Komplexes. Eine "offene" Form des SPI_p (weiß, Cartoon) basiert auf der Ausrichtung der Aminosäuren Lys7 und Met8 des IP2. Die Lage des IP2 dreht SPI_p in eine relative Position zu MTG, die verglichen mit der geschlossenen Form des SPI_p keine größeren Kollisionen zeigt. C) hypothetische offene Form des SPI_p mit dem grün gefärbten N-Terminus, der aus der SPI_p-DPBB-Kerndomäne herausgeschwungen ist. D) geschlossene Form von SPI_p mit seinen gelb gefärbten N-terminalen Resten.

Zusammenfassend war das MTG-Cys64-Thiolat irreversibel an das IP2 durch Ausbildung einer Thioetherbindung gebunden. Bei der Bindung des Peptides traten Konformationsänderungen der Aminosäuren Ser6 (OAS6, entsprechend Gln6 im SPI_p), Lys7 und Met8 im Vergleich zu ihrer Konformation in der SPI_p-Struktur auf. Die IP2-Aminosäuren Ile4, Gly5 und Ser6 befinden sich in der

Komplexstruktur am Boden des katalytischen Spaltes der MTG, wobei die beiden Peptidtermini, wie von Kashiwagi und Kollegen vorgeschlagen [50], auf das vordere Vestibül ausgerichtet sind. Die Ausrichtung der Peptideinheiten von IP2 aus dem engen MTG-Spaltboden widerspricht der Annahme, dass das Glutamin-Donorprotein vor der Bildung des primären Acyl-Enzym-(Thioester)-Komplexes eng mit der MTG wechselwirken muss. In Übereinstimmung damit zeigt der Zusammenstoß der DPBB-Domäne des SPI_p mit der MTG, dass eine Ablösung des N-Terminus des SPI_p von der DPBB-Kernstruktur der Bindung und Modifikation durch MTG vorausgeht. Diese Beobachtung und die MTG-induzierte IP2-Konformation scheinen mit einem Modell, welches die Selbstorganisation der Substratproteine voraussetzt, konsistenter zu sein (Abbildung 59).

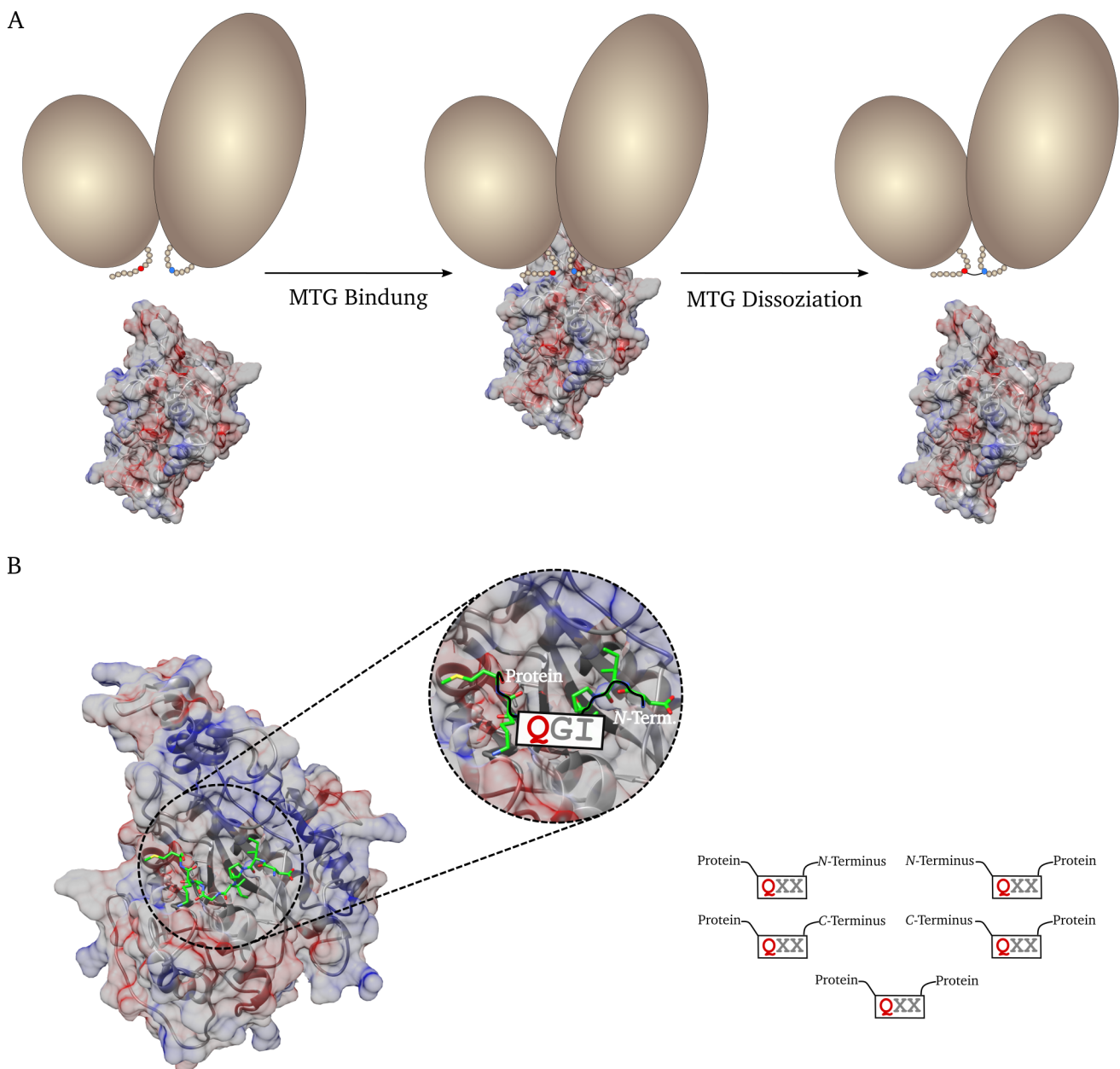


Abbildung 59: Modell für die MTG-vermittelte Vernetzung und Proteinmodifikation [173].

A) Selbstorganisation von Substratproteinen und reißverschlussartige Vernetzung durch MTG. B) Mögliche Interaktion von Substratproteinen mit MTG, abgeleitet von der Position des IP2 in der katalytischen Spalte.

In diesem Fall ragen die Glutamin- und Lysinreste aus der gebildeten Proteinschicht heraus und werden durch MTG in einem Reißverschlussartigen Mechanismus vernetzt (Abbildung 59A). Mindestens sieben von zehn IP2-Aminosäuren besetzen den Innenraum des katalytischen Spaltes, was nahe legt, dass das zugängliche Glutamin in einer ausgedehnten flexiblen Schleife wie Gln39 bei DAIP [82] oder an einem terminalen Ende, wie es bei SPI_p der Fall ist, lokalisiert sein muss.

4. Diskussion

4.1. Transglutaminase aktivierende Metalloprotease

Wie einleitend beschrieben produziert *Streptomyces mobaraensis* eine Calcium-unabhängige Transglutaminase (MTG), die durch proteolytische Abspaltung eines *N*-terminalen Propeptids zum reifen Enzym aktiviert wird (Abbildung 5) [59]. Diese Reaktion wird durch die Transglutaminase aktivierende Metalloprotease (TAMP) katalysiert. Die spezifische Aktivierung der MTG ermöglicht *S. mobaraensis* die proteolytische Regulierung der Transpeptidierungsreaktion und ein Unterbinden willkürlich auftretender Vernetzungsreaktionen. Somit ist eine spezifische Aktivierung des Enzym während der Sporenreifung zur Ausbildung der Sporenhülle, wie für *Bacillus subtilis* beschrieben [54], aber auch die Ausbildung einer Schutzhülle durch Vernetzung von Inhibitorproteinen wie DAIP, SSTI und SPI zur Abwehr von Fressfeinden vorstellbar [55]. Untersuchungen mit der MTG aktivierenden Metalloprotease TAMP zeigten die Interaktion und Regulation der Protease durch ein Transglutaminase-Substrat, dem SSTI. Zotzel *et al.* gelang erstmals die Isolierung der TAMP aus Oberflächenkulturen von *S. mobaraensis* und ihre biochemische Charakterisierung [72]. Das etablierte Isolierungsverfahren der TAMP aus *S. mobaraensis* eignete sich jedoch nur zur Bereitstellung geringer Mengen an aktivem Enzym. Für die weiterführende physiko- und biochemische Charakterisierung der TAMP mit ihrem natürlichen Substrat (MTG) und ihrem Inhibitor (SSTI) wie auch industrielle Verfahren waren jedoch größere Mengen der Protease in hoher Reinheit notwendig. Das in dieser Arbeit etablierte rekombinante Produktionsverfahren von TAMP in *E. coli* eignete sich zur Bereitstellung ausreichender Mengen hochreiner Protease. Die Analyse und Charakterisierung der rekombinant produzierten TAMP offenbarten neben strukturellen Unterschieden auch große Gemeinsamkeiten mit der TAMP aus *S. mobaraensis* (*Sm*-TAMP). Beide Proteasen besitzen den gleichen *N*-Terminus [72], weisen jedoch unterschiedliche *C*-Termini auf. Im Vergleich mit *Sm*-TAMP und anderen M4-Metalloproteasen [128, 129] ist *r*TAMP mit einer P-Domäne von Proprotein-Konvertasen fusioniert. Dieses Strukturelement scheint ein allgemeines Merkmal TAMP-ähnlicher Metalloproteasen bei Streptomyceten zu sein, wie ein Sequenzvergleich zeigt (Abbildung 60). Die gegenüber Dispase höhere Temperaturstabilität weist darauf hin, dass höchstwahrscheinlich drei Calciumionen, eine Cysteinbrücke und die P-Domäne die Proteinstruktur stabilisieren. Die P-Domäne als Strukturelement ist bspw. für Serin-Endopeptidasen der Familie S8 beschrieben. Sie scheint für die richtige Faltung während der Expression, die pH-Abhängigkeit sowie die Calciumbindung verantwortlich zu sein [175, 176]. Interessanterweise beinhaltet die P-Domäne ein RGD-Motiv, ein Integrin-bindendes Sequenzmotiv, welches bei Eukaryoten zur intrazellulären Kompartimentierung und zum Erhalt der Enzymaktivität dient [177]. Bei der Proprotein-Konvertase PC1 ist das RGD-Motiv für die Integrität des Zymogens, die C-terminale Prozessierung und den zellulären Transport wichtig [177, 178].

gereinigter *rTAMP* nicht mehr auftrat. Ein korrespondierendes Gegenstück war jedoch nicht nachweisbar, was ebenfalls auf eine Struktur-stabilisierende Wirkung dieser Domäne hinweist. Die Bedeutung der TAMP für die MTG-Prozessierung wird durch eine hohe katalytische Effizienz ($103053 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) bei neutralem pH hervorgehoben. Die Aktivierung der MTG erfolgte bei extrem niedriger *rTAMP*-Konzentration, wodurch das Risiko einer weiteren MTG-Hydrolyse und somit Fragmentierung verringert wird. Entsprechend konnte keine weitere Hydrolyse der aktivierten MTG durch *rTAMP*, weder über SDS-PAGE noch durch Massenspektrometrie, beobachtet werden. Hinsichtlich der Interaktion mit dem natürlichen Inhibitor SSTI scheint *rTAMP* ähnliche Eigenschaften zu besitzen, wie sie für *Sm-TAMP* durch Zotzel *et al.* beschrieben wurden [72]. Auf Grundlage dessen erfolgte die Charakterisierung der Interaktion zwischen TAMP und SSTI mit der rekombinanten Variante der Protease. Neben der Möglichkeit der physiko- und biochemischen Charakterisierung der TAMP und mit ihr assoziierter Proteine schließt das etablierte Produktionsverfahren für *rTAMP* eine Lücke in der rekombinanten industriellen Produktion von MTG. MTG, ursprünglich für die Lebensmittelindustrie hergestellt [51], hat aufgrund ihrer Fähigkeit, hochspezifische Konjugationsreaktionen zu katalysieren, Einzug in die Produktionsverfahren medizinischer Proteinkonjugate gehalten [81, 87, 179, 180]. Das Hauptproblem für pharmazeutische Anwendungen ist die Verfügbarkeit von MTG in definierter Struktur und katalytischer Aktivität. Darüber hinaus werden gentechnisch veränderte MTG-Varianten erzeugt, um die Spezifität gegenüber verschiedenen therapeutischen Proteinen zu generieren und zu erhöhen. Gegenwärtig ist die Mutation von *S. mobaraensis* oder anderen Streptomyceten schwierig und unzuverlässig [115, 181]; des weiteren ergibt die Reinigung aus Kulturüberständen keine homogene, aktive MTG, da nicht untersuchte Proteasen, Proteaseinhibitoren und andere Verbindungen die Struktur und Funktion der MTG beeinflussen können. Die rekombinante Produktion in Wirtszellen wie *E. coli* scheint die einzige Möglichkeit zu sein, die Anforderungen an die Homogenität der MTG zu erfüllen. Jedoch scheitert die rekombinante Produktion des aktiven Enzyms wegen Vernetzung intrazellulärer Wirtszellproteine, die zum Zelltod führt [182]. Die Lösung stellt eine Produktion von MTG-Zymogenen dar, wodurch eine Aktivierung im Anschluss an die Produktion und Reinigung unumgänglich wird. Die Hydrolyse des Propeptides kann durch eine Reihe von Proteasen erfolgen. Dazu zählt Dispase (Bacillolysin), Chymotrypsin, Trypsin und Proteinase K [72, 183-185]. Der entscheidende Nachteil bei der Verwendung dieser Proteasen ist jedoch eine undefinierte weitere Proteolyse der aktivierten MTG, was zu inhomogenen Enzymgemischen führt. Durch die rekombinante Produktion der TAMP kann eine spezifische Protease zur Verfügung gestellt werden, die keine unerwünschten Nebenprodukte bei der MTG-Aktivierung erzeugt. Somit kann eine definierte Aktivierung der rekombinanten MTG sowie von MTG-Varianten sichergestellt werden. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass TAMP mit seinem

Inhibitorprotein SSTI in immobilisierter Form einfach aus der Reaktionsmischung entfernt werden kann.

4.2. *Streptomyces* Subtilisin- und TAMP-Inhibitor

Im Lebenszyklus von Streptomyceten kommt es bei der Erschöpfung von Nährstoffen zu einem Apoptose-artigen Absterben des Substratmycel und damit verbunden einem Abbau der gespeicherten Nährstoffe, die den Aufbau und die Entwicklung von Lufthyphen und Sporen ermöglichen [77, 186]. Während dieser Entwicklungsphase erfolgt auch der Proteinabbau durch eine Reihe von Serin- und Metalloproteasen. Für die Regulierung der Proteasen produzieren Streptomyceten eine Vielzahl inhibitorischer Peptide und Proteine. Diese Proteaseinhibitoren werden je nach Spezifität als *Streptomyces*-Subtilisin (SSI)- oder SSI-ähnliche Inhibitoren (SIL) bezeichnet. Ihre hohe Spezifität und Affinität zu der namensgebenden Protease Subtilisin legt die Nutzung dieser Inhibitoren als Schutzschild gegen Subtilisin-produzierende Mikroorganismen der Gattung *Bacillus*, die die Protease bei Beginn ihrer Sporulation produzieren, oder von Pilzen (*Tritirachium album*, *Thermoactinomyces vulgaris*) nahe [187-189]. Diese Organismen nutzen Subtilisin bspw. zum Abbau von Nährstoffen außerhalb der Zelle.

Aufgrund ihres verbreiteten Vorkommens und ihrer hohen Stabilität wurden SSI-Proteine bereits über mehrere Jahrzehnte intensiv untersucht [190]. Dabei erfolgte vornehmlich die Charakterisierung der Bindestelle für das namensgebende Subtilisin. Für die Interaktion mit der Serinprotease wurde eine ausgedehnte Schleife gegenüber der Dimerisierungsfläche der SSI-Varianten, die durch eine C-terminale α -Helix-Cysteinbrücke stabilisiert wird, bestimmt. Der SSI (P01006) von *S. albogriseolus* S-3253 gehört zu den am besten charakterisierten SSI-Varianten. Die maßgeblich an der Inhibierung von Subtilisin beteiligte Aminosäure ist Met104. Durch Kristallisation konnte gezeigt werden, dass das betreffende Methionin die S1-Tasche des Subtilisin im binären Kristall besetzt und somit die Inhibierung hervorruft [93, 133]. Durch Variation der Aminosäure in Position 104 gelang auch die Änderung der Spezifität des inhibitorischen Proteins. Der Austausch gegen Lys (Arg) und Tyr (Trp) ermöglichte die Inhibierung von Trypsin-ähnlichen bzw. Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen durch SSI [92]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bestimmte SSI-Varianten in der Lage sind Metalloproteasen zu inhibieren [72, 94, 95]. Bei der Inhibierung von Metalloproteasen zeichnen sich zwei unterschiedliche Arten bzw. Bindestellen für die betreffende Metalloprotease ab. Die einen sind mit dem Inhibitor von *S. caespitosus*, ScNPI, verwandt, die anderen mit den viel häufigeren SSI-ähnliche Varianten. Die Inhibierung der neutralen Protease von *S. caespitosus* (ScNP, P56406) wird vornehmlich durch das Tyr61 des ScNP-Inhibitors (ScNPI, Q9FDS0) hervorgerufen, welches in der $\beta 2/\beta 3$ -Verbindungsschleife zwei Reste jenseits der N-terminalen Cysteinbrücke lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu weisen die SSI-ähnlichen Inhibitoren an dieser Stelle ein konserviertes Prolin auf (SSI-

Pro68, Abbildung 26). Deshalb wurde vermutet, dass die inhibierenden Aminosäuren für SGMPII (SgmA, Griselysin, B1W035/Q83WH1) in der identifizierten Subtilisin-Bindeschleife von SSI liegen. Der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb der Subtilisin-affinen Methionin-Schleife reduzierte die Dissoziationskonstante des SGMPII-SSI-Komplexes aber nur um eine Größenordnung [94]. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der untersuchte SSTI zu der überwiegenden Mehrheit der SSI-verwandten Metalloprotease-Inhibitoren gehört, obwohl die vorgeschlagene SGMPII-Bindestelle für die Transglutaminase aktivierende Metalloprotease TAMP nicht bestätigt werden konnte [94]. Stattdessen wurde die inhibitorische Aktivität des SSTI im N-terminalen Peptid identifiziert, welches ein hoch konserviertes Leu-Tyr-Motiv beinhaltet (Abbildung 61). Die in dieser Arbeit durchgeführten ITC-Messungen zeigten zusätzlich den direkten Einfluss eines N-terminalen Verlängerungspeptids auf die Inhibierung der TAMP. War der N-Terminus um 3 oder 6 Aminosäuren erweitert, war die Interaktion mit der Metalloprotease beeinträchtigt. Seine Einkürzung führte jedoch bis zum kompletten Verlust der Aktivität, sobald Leu40 und Tyr41 fehlten.

Die Ergebnisse legen nahe, dass andere SSTI-ähnliche Proteine, darunter der gegen SGMPII gerichtete SgiA oder der häufig untersuchte SSI [191], das Leu-Tyr-Motiv für die Inhibierung von Metalloprotease nutzen. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass die Aufhebung der inhibitorischen Aktivität bei früheren Experimenten nicht gelang. Des weiteren zeigten Studien mit dem SSI-ähnlichen *Streptomyces*-Antikoagulan (SACI, Q7M1B5, WP_071963030) aus *S. cinnamoneus* einen vergleichbaren Inhibierungsmechanismus des SSI-ähnlichen Inhibitors [192]. Neben SACI gelang die Isolierung N-terminal eingekürzter Varianten des SACI aus dem Kulturüberstand von *S. cinnamoneus*. Die Verkürzung des SACI-Proteins hatte den Verlust der inhibitorischen Aktivität gegenüber Thermolysin zur Folge, die Aktivität gegenüber Subtilisin blieb jedoch erhalten. Dabei wiesen die inaktiven Variante SACII und SACIII einen gegenüber SACI um Ser-Leu und Ser-Leu-Tyr verkürzten N-Terminus auf [192] (Abbildung 61).

```

1|P83544|      MRYITGGIALGSLILGSLVGAGATASATP--APAP---AAQSSLYAPSALVLTVGQGDKAASAGVQRAVTLNCPKPSGTHPDARGACD 85
2|A0A0K9X972| MRYITGGIALGSLILGSLVGAGTSATAAPATAPAP---AAQSSLYAPSALVLTVAQGESSTNSGVQRAVTLTCTPKPGTHPDARGACN 87
3|A0A2N8NML4| MRYITGGIAMGAALILGGGLAAAGTTTASAPTPVPAAQAQTSLSYAPSALVLTIGQGATAAESGVQRAVTLTCTPKSSGTHPDAGACT 90
4|A0A1Z2L992| MRYITGGIAMGAALILGGGLAAAGTTTASAAPKPAPAAAAQTQSSLYAPSALVLTVGQATAAESGVQRAVTLTCTPKASGSHPDAGACT 90
5|A0A1S6RG02| MRKTTGAIGLGAALAVSAVLIGITSGTASAE-----AKQSSLYPPSALVLTVGWGADAATTEVQRAVTLSCRPTATGTHPAPAKACA 83
6|WP_071963030| MRYITGGIALGAALALGGLVGAGTSASAEAPAPAPAA---QTQSSLYAPSALVLTIGQGDSAATAGIQRAVTLTCTPKADGTHPNTRGACA 86
              **  **.*.:**.* :.. :. :. :.*
7|Q7M1B5|      -----SLYAPSALVLTIGQGDAAAAGIQRAVTLTCTPKADGTHPNTRGACA 47
              *** *****.: * :. :. :*****.* * .*:** **

1|P83544|      QLRAASGNFAEIT-KIKSGTACTEWNPFVVTAEGVWEGQRVKYEHTFANPCEMKAGKGTVFEF 148
2|A0A0K9X972| ELRAAGGKFEDIT-KVKAGTACTEWNPYVVTAEGVWEGQRVKFEHTFGNTCELKAGKGIVFEF 150
3|A0A2N8NML4| QLRAAGGDFDKVT-RIKSDTVCTEWNPTVVTAEGVWDGRRISYEHTFANPCMAKAGKGLVFEF 153
4|A0A1Z2L992| QLRAAGGDFDKVT-RIKSDTVCTEWNPTVVTAEGVWDGRRVSYEHTFANPCMAKAGKGLVFEF 153
5|A0A1S6RG02| ELRSVGGTFQQLRTGAEPGRVCTEWHPIITVTAEGIWDGRRVSYEHTFANNCFKSAAPTIVFEF 147
6|WP_071963030| QLRLAGGDFEKVT-KIKEGTACTEWNPSVVTAEGVWEGRRVSFERTFANPCEMKAGKGMVFEF 149
7|Q7M1B5|      QLRLAGGDFEKVT-KIKEGTACTEWNPSVVTAEGVWEGRRVSFERTFANPCELKAGKGTVFEF 110
              :** ..* * .: :. :.*:**.* .*****:*:*:..:***.* * .*. ****

```

Abbildung 61: SSTI und verwandte Proteine von Streptomyceten.

Der Sequenzvergleich wurde mit Clustal Ω V 1.2.4 erstellt. 1, P83543, *S. mobaraensis*; 2, A0A0K9X972, *S. caatingaensis*; 3, A0A2N8NML4, *S. eurocidicus*; 4, A0A1Z2L992, *S. albireticuli*; 5, A0A1S6RG02, *S. hygrosopicus*; 6, WP_071963030, *S. cinnamoneus*, 7, Q7M1B5, SACL, *S. cinnamoneus* (Sv. *cinnamoneum*). Mit dem SignalP 4.1 Server [136] ermittelte Signalsequenzen sind in grün gekennzeichnet, aromatische Aminosäuren in blau und Glutamine in rot. Durch Edman-Abbau bestimmte Sequenzen sind rot unterstrichen. Die in der Literatur ermittelten möglichen Bindestellenbereiche für Subtilisin und die *S. caespitosus* Metalloprotease sind mit gelben Boxen gekennzeichnet. Die durch diese Arbeit bestimmte Bindestelle für TAMP ist grün und das N-terminale Peptid für die Interaktion mit der MTG ist rot gerahmt.

Darüber hinaus konnte in einer ¹H-NMR-Studie gezeigt werden, dass das N-terminale Peptid des SSTI von *S. albobriseolus* frei beweglich ist und schnellen Bewegungen im Nanosekundenbereich unterliegt [193]. Eine solche Flexibilität ermöglicht eine gute Zugänglichkeit und Anpassungsfähigkeit für die Wechselwirkung mit der Metalloprotease.

Neben der inhibitorischen Funktion gegenüber TAMP kommt dem N-terminalen Peptid eine zweite Funktion als Glutaminbindestelle von mikrobieller Transglutaminase für die enzymatische Proteinvernetzung zu. Biotinylierungsexperimente mit MTG und Biotinylcadaverin belegen, dass die mikrobielle Transglutaminase (MTG) uneingeschränkten Zugang zu N-terminal verlängerten SSTI-Varianten mit einem Glutaminpaar hat. Als günstigste Variante für den Einbau des Biotinylcadaverins stellte sich APAAQQ-SSTI heraus. Die Markierung erfolgte sofort nach Zugabe des Enzyms und war unter den gegebenen Bedingungen nach 30 Minuten nahezu beendet. Die Länge des N-terminalen Peptides beeinflusst demzufolge nicht nur die inhibitorische Aktivität, sondern auch die Substrateigenschaften des SSTI für die MTG. Die Wechselwirkungen zwischen SSTI und MTG sowie SSTI und TAMP werden durch das Verlängerungspeptid jedoch gegenläufig reguliert. Wie Studien zeigten, kann eine Verkürzung des SSTI und der Verlust der MTG-zugänglichen Glutamine leicht während der Kultivierung von *S. mobaraensis* verfolgt werden [89]. Die Fülle an AP-Motiven im Verlängerungspeptid deutet auf eine sukzessive Abspaltung kleiner Peptide durch die in einem frühen Kulturstadium produzierte Tripeptidyl-Amino-peptidase hin (Abbildung 61). Damit ist eine posttranslationale hydrolytische Modifikation des SSTI möglich, die sich sowohl auf die Markierbarkeit als auch auf die inhibitorische Aktivität des Moleküls auswirkt. Eine Entfernung des SSTI-

Glutaminpaares unterbricht die SSTI-Vernetzung und reduziert als Konsequenz die Aktivität von TAMP und die TAMP-vermittelte MTG-Aktivierung. *S. mobaraensis* steht so ein abhängiges Aktivierungs- und Inhibierungssystem für die Regulation der MTG zur Verfügung. Des weiteren können nicht proteolytisch eingekürzte SSTI-Moleküle (die ein QQ-Motiv beinhalten) sowie andere Substratproteine wie DAIP oder SPI_p in die Proteinhülle von *S. mobaraensis* eingebaut werden und durch ihre Eigenschaften zum Schutz des Organismus beitragen. Zieht man noch die Inhibierung von Subtilisin in Betracht, so scheint SSTI eine wichtige Rolle im Lebenszyklus und in der Verteidigung von *S. mobaraensis* einzunehmen.

4.3. *Streptomyces*-Papaininhibitor

Neben dem Dispase-Autolyse-induzierenden Protein (DAIP) und dem *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMP-Inhibitor (SSTI) ist der *Streptomyces*-Papain-Inhibitor der am besten charakterisierte, durch Transglutaminase-vernetzbare Proteaseinhibitor von *S. mobaraensis*. Die rekombinante Produktion offenbarte, dass der SPI aus einem proteinogenen Teil dem SPI-Protein (SPI_p) und einer inhibitorisch aktiven niedermolekularen Substanz dem SPI_{ac} (ac für *active compound*) besteht [96]. Untersuchungen in dieser Arbeit führten zur strukturellen Aufklärung beider Moleküle.

4.3.1. SPI_{ac}

Actinobakterien stellen seit den 60er Jahren eine Quelle für die Entdeckung und Isolierung von Proteaseinhibitoren dar. Darunter finden sich neben proteinogenen Inhibitoren hauptsächlich niedermolekulare Substanzen mit einer breiten Spezifität [194]. Die Isolierung und Charakterisierung von Leupeptin durch Aoyagi *et al.* 1969 [145, 195] aus Actinomyceten stellt eine der ersten Beschreibungen eines solchen Inhibitors dar. Die Aktivität vieler dieser Inhibitoren, bei denen es sich oft um Peptidanaloga handelt, wird durch eine Carboxy-terminale Aminosäure-Aldehydfunktion hervorgerufen [196]. Die am besten charakterisierten Vertreter sind Leupeptin [197] und Antipain [139] mit einem Arginin-Aldehyd, Elastatin [198] mit einem Alanin-Aldehyd und Chymostatin [199] sowie MAPI [200] mit einem Phenylalanin-Aldehyd. Für die inhibitorische Aktivität dieser Aldehyd-Peptide sind zwei Faktoren von entscheidender Bedeutung. Der eine betrifft die Komplementarität zwischen dem Peptid und der Substratbindetasche der Protease, um die richtige Orientierung des Peptides zu ermöglichen, der andere die räumliche Nähe der Aldehydfunktion zum reaktiven Cystein bzw. Serin im aktiven Zentrum der Protease. Dies führt zu einer Stabilisierung des Enzym-Inhibitor-Komplexes durch Ausbildung eines anionischen Hemiacetals oder Hemithioacetals [196, 201, 202]. Die Untersuchungen zur Struktur des SPI_{ac} offenbarten zwei neue Verbindungen, die ebenfalls in die Familie der inhibitorischen Aldehydpeptide einzugliedern und in ihrer Grundstruktur mit Chymostatin verwandt sind (Abbildung 38).

Chymostatin ist ein potenter Inhibitor von Serin- und Cysteinproteasen. Bei Chymostatin (Phe-NHCONH-Arg-Xaa-Phe-al) ist Carboxy-terminal eine reaktive Phenylalanin-Aldehydfunktion lokalisiert, die mit einer aliphatischen Aminosäure (Xaa = Leu, Ile, Val) verknüpft ist. Durch die Variation der AS in dieser Position entstanden drei Varianten des Chymostatins. Chymostatin A weist ein Leucin, B ein Valin und C ein Isoleucin in dieser Position auf [199]. Da es sich bei allen drei Aminosäuren um nicht polare, hydrophobe Aminosäuren handelt, gibt es auch keine signifikanten Unterschiede in der inhibitorischen Aktivität der drei Varianten. Daran angeschlossen ist über eine Peptidbindung eine stark basische Aminosäure, die wiederum über ein Carbamid mit einer weiteren hydrophoben Aminosäure verbunden ist [196]. Dadurch tritt kein freier *N*-Terminus auf.

Eine Studie zur Charakterisierung des Chymostatins im Bezug auf die inhibitorische Aktivität gegenüber Chymotrypsin identifizierte Strukturmerkmale, die signifikant zur Bindung der Protease beitragen [196]. Die Synthese eingekürzter Chymostatin-Varianten wie Z-Arg-(Leu/Val/Ile)-Phe-al offenbarte den geringen Einfluss des carboxamidständigen Phenylalanins auf die inhibitorische Aktivität der drei Chymostatin-Analoga [202]. Vergleichbare Tripeptide als Semicarbazon-Varianten zeigten hingegen 30-40-fach höhere IC₅₀-Werte, was den signifikanten Beitrag der Aldehydfunktion zur Inhibierung deutlich unterstrich. Neben der Aldehydfunktion erwies sich auch die basische Aminosäure als essentiell für die Chymotrypsin-Inhibierung. Dipeptid-Varianten hatten bis zu 100-fach höhere IC₅₀-Werte im Vergleich mit den Tripeptid-Varianten [196]. Legt man diese Studie zugrunde, ist der einzige, potentiell für die inhibitorische Aktivität signifikante Unterschied zwischen Chymostatin B und den identifizierten SPI_{ac}-Derivaten die Hydroxylgruppe am Tyrosinal des SPI-AC1. Anders als bei Chymostatin konnten keine SPI_{ac}-Varianten isoliert werden, die in der Valin-Position variierten. Stattdessen stellte sich bei SPI_{ac} die Kopfgruppe (mit entsprechender Aldehydfunktion) als variable Position heraus. Erste inhibitorische Charakterisierungen der SPI_{ac}-Varianten zeigten keinen signifikanten Einfluss der Hydroxylgruppe auf die inhibitorische Aktivität gegenüber Chymotrypsin. Die Untersuchungen mit Papain offenbarten jedoch leichte Unterschiede in der Inhibierung der beiden SPI_{ac}-Derivate. Um den Effekt der Hydroxylgruppe auf die Inhibierung von Chymotrypsin und Papain genauer zu charakterisieren, sind jedoch weiterführende kinetische Untersuchung geplant.

Delbaere und Brayer *et al.* gelang durch Röntgenstrukturanalyse die strukturelle Beschreibung der Interaktionen zwischen Chymostatin A und der *Streptomyces griseus* Proteinase A (SGPA, P00776) [203, 204]. Die Hauptinteraktion erfolgt, wie durch vorhergehende Studien vermutet, über die Ausbildung einer Hemiacetalbindung zwischen dem Ser195 im aktiven Zentrum der SGPA und der Aldehydfunktion des Chymostatins. Durch Imitierung des tetraedrischen Übergangszustandes während der proteolytischen Katalyse [205] und durch Bindung der Phenylalaninseitenkette in der S1-Bindetasche des Proteins wird das Pseudointermediat stabilisiert. Des Weiteren ist Leucin von Chymostatin A zur hydrophoben S2-Tasche von SGPA orientiert. Die finale Stabilisierung erfolgt über

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hauptkette des Inhibitors und des Enzyms [202, 204]. SPI-AC2 bindet an Papain wie Chymostatin an SGPA. In ähnlicher Weise kommt es zur Ausbildung eines tetraedrischen Hemithioacetals mit Ausrichtung des Aldehydsauerstoffs zur Oxyanion-Tasche im aktiven Zentrum des Papains. Der hydrophobe Benzylrest ist dabei ebenfalls zur S1-Bindetasche der Protease orientiert. Das Valin des AC2 zeigt hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Papain und das AC2-Rückgrat kann zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Papain ausbilden, was ebenfalls zur Stabilisierung der Bindung beiträgt. Ähnliche Beobachtungen wurden für die Lage und die Interaktionen des Leupeptins mit Papain gemacht [146]. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Lage und die Interaktion des AC1 und AC2 mit Chymotrypsin denen von AC2 / Papain und Chymostatin / SGPA vergleichbar sind [203, 204].

Proteolytische Enzyme spielen in der Regulation vieler biologischer Prozesse und in vielen biotechnologischen Anwendungen eine wichtige Rolle [206]. In biotechnologischen Prozessen werden Proteaseinhibitoren bspw. zur präventiven Unterdrückung der Hydrolyse rekombinanter Proteine bei Produktions- und Reinigungsprozessen verwendet. Des weiteren stellen sie gute Liganden für die Affinitätschromatographie von Proteasen dar. Nach Kopplung der Inhibitoren an eine feste Matrix ermöglichen sie die selektive Reinigung der Zielprotease [206]. Chymostatin-Analoga wurden für die Reinigung der *Streptomyces griseus* Protease B an Sepharose gekoppelt. Nach spezifischer Bindung an den Liganden ließ sich durch gezielte Elution ein hoher Reinheitsgrad der Protease realisieren [207]. Vergleichbare Anwendungen sind für die isolierten SPI_{ac}-Varianten vorstellbar.

In der Medizin werden Proteaseinhibitoren sowohl diagnostisch als auch therapeutisch eingesetzt. Sie finden Anwendung bei viralen, bakteriellen, fungalen sowie parasitären Erkrankungen, aber auch bei der Behandlung von Krebs und immunologischer, neurodegenerativer sowie kardiovaskulärer Erkrankungen [206]. Ähnlich wie andere mikrobielle Proteaseinhibitoren ist Chymostatin relativ untoxisch und wird von einer Reihe intakter Zellsysteme gut toleriert. Die Substanz ist ein Inhibitor der lysosomalen und nicht-lysosomalen Proteinabbauwege [208-210]. Des weiteren ist Chymostatin ein Inhibitor des zytosolischen Ca²⁺-abhängigen Calpains [211]. Viele kleine inhibitorische Moleküle bakteriellen Ursprungs wie Chymostatin und SPI_{ac} zeigen eine breite inhibitorische Spezifität und inhibieren Proteasen unterschiedlicher Familien [206]. Ihre breite Spezifität stellt für die medizinische Anwendung oft ein Problem dar, da eine krankheitsassoziierte Protease selektiv inhibiert werden muss. Um die Selektivität zu verbessern, wurde die ursprüngliche Leitstruktur von Aldehydpeptiden für die Produktion inhibitorischer Analoga verwendet, die eine erhöhte Spezifität für bestimmte Proteasen aufweisen. Am besten charakterisiert ist dabei das Epoxysuccinyl-Peptid E-46, ein Cysteinproteaseinhibitor, der ursprünglich aus *Aspergillus japonicus* isoliert und charakterisiert wurde [212]. Die Derivate wurden auf ihre Eignung als Antitumorreagenz in Zellkultur sowie in Tiermodellen getestet. Besonders wichtig war dabei, zwischen verschiedenen Typen von Cysteinproteasen zu

unterscheiden. Die Derivate von E-64 zeigten die entsprechende Selektivität [213], was ihre Eignung für die Behandlung von Krebs und anderer Krankheiten nahelegte. In Tiermodellen konnten auch die positiven Eigenschaften eines E-64 Derivats (CA-076) belegt werden, indem die Reduzierung des Tumorstwachstums, der Tumorzellinvasion und der Tumorangio-genese für viele Krebsarten nachgewiesen wurde [214, 215]. Neben Cysteinproteasen wurden auch Serinproteasen für die spezifische Inhibierung in der Krebstherapie adressiert, darunter der Urokinase-Plasminogen-Aktivator und die Matritase [216, 217]. Des weiteren konnte für Leupeptin und Antipain gezeigt werden, dass sie die maligne Transformation von Zellen [218] und die Tumorgenese [219] inhibieren.

Wie für E-64 beschrieben, ist ein Design auf Basis von Kristallstrukturen für die Ableitung von SPI_{ac}-Analoge vorstellbar, um so die Selektivität für spezifische Cystein- bzw. Serinproteasen zu erhöhen und sie in Zellkultur oder Tiermodellen zu testen. Nach einer umfänglichen strukturellen, bio- sowie physikochemischen Charakterisierung könnten entsprechende Analoga für die spezifische Inhibierung von Zielproteasen synthetisiert und charakterisiert werden.

Ein weiterer medizinischer Ansatz sind die inhibitorischen Eigenschaften des Holo-SPI gegenüber den Cysteinproteasen Gingipain K und R (KGP und RGP) aus *Porphyromonas gingivalis* [96]. Die strukturellen Eigenschaften der identifizierten SPI_{ac}-Derivate legen nahe, dass beide SPI_{ac}-Varianten die Cysteinproteasen inhibieren und somit für die inhibitorischen Eigenschaften des Holo-SPI gegenüber KGP und RGP verantwortlich sind. Gingipaine verursachen den Abbau von Typ-I-Kollagen, welches die Hauptform des Kollagens in parodontalen Geweben darstellt. Studien mit Proteaseinhibitoren konnten zeigen, dass die Inhibierung der Gingipaine ihre Fähigkeit reduziert, Typ-I-Kollagen abzubauen [220]. Leupeptin und andere Proteaseinhibitoren inhibierten die enzymatische Kollagenhydrolyse, die durch *P. gingivalis* verursacht wurde [221]. Dieser Studie zufolge und aufgrund der inhibitorischen Eigenschaften stellen die SPI_{ac}-Varianten interessante Verbindungen für die Entwicklung eines Medikaments gegen chronische Parodontitis dar.

4.3.2. SPI_p-Struktur

Das erstmals 2011 durch Sarafeddinov beschriebene *Streptomyces*-Papain-Inhibitorprotein, SPI_p, war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen zur Aufklärung von Funktion und Struktur [30, 55, 96]. Der Vergleich auf Primärsequenze-bene zeigte die Homologie des SPI_p zu einem Protein von *S. lavendulae* (Q9X5U4) [30], welches sich im Gencluster für Enzyme befindet, die die Biosynthese des Antibiotikums Mitomycin C bewirken [222]. Das unbekannte Protein ließ jedoch über die Sequenzhomologie hinaus die Zuordnung einer biologischen Funktion von SPI_p nicht zu. Die beobachtete inhibitorische Aktivität gegenüber Proteasen war, wie oben gezeigt, ausschließlich eine Funktion der SPI_{ac}-Tetrapeptide.

SPI_p ist ein sekretorisches Protein von *S. mobaraensis* mit einem 33 Aminosäure langen Signalpeptid. Reifes SPI_p weist mit 110 AS eine molare Masse von 12027 Da und einen experimentell ermittelten pI von 7.3 auf [55]. Das Protein zeigt eine sehr hohe Thermostabilität, die durch Schmelzpunktanalysen belegt werden konnte. Für den SPI_p aus *S. mobaraensis* ergab sich dabei eine Schmelztemperatur von ca. 85 °C. Mit *S. mobaraensis* wurden die höchsten Produktionsausbeuten von SPI_p bei einer Wachstumstemperatur von ca. 42 °C erhalten, was zu der Vermutung Anlass gab, dass SPI_p durch thermalen Stress induziert wird [55]. Die hohe Thermostabilität ist auf die kompakte Struktur des SPI_p und zwei Cysteinbrücken zurückzuführen. Die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse am HZI in Braunschweig ermöglichte die Strukturaufklärung des Proteins anhand der D1-Domäne des Expansins (PDB 4JCW) von *Clavibacter michiganensis* als molekulares Ersatzmodell. SPI_p und die D1-Domäne des Expansins haben eine Sequenzidentität von 30%, beide Strukturen stimmen dennoch sehr gut mit einer geringen quadratischen Standardabweichung von 0.75 Å überein. Expansin D1 und SPI_p weisen beide eine Doppel-psi-Beta-Barrel-(DPBB)-Struktur auf, die zuerst für Barwin, einem Pflanzenabwehrprotein, und für die Endoglucanase V von *Humicola insolens* beschrieben wurde [158, 159] (Abbildung 48). Die DPBB-Domäne findet sich auch in der konservierten N-terminalen Domäne des seltenen Lipoproteins A (RlpA), einer lytischen Transglycosylase, die am Zellteilungsprozess von *Pseudomonas aeruginosa* beteiligt ist [160]. Ein entsprechender Nachweis für eine enzymatische Funktion konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht erbracht werden. Neben der enzymatischen Funktionalität sind DPBBs an der Cofaktor- sowie Ligandenbindung beteiligt [161]. Demzufolge lag es nahe, dass eine Bindung des SPI_{ac} an die DPBB-Struktur des SPI_p erfolgt. Jedoch konnte bei pH 8.0 keine Interaktion zwischen den Molekülen durch isothermale Titrationskalorimetrie gezeigt werden. Für die ausbleibende Interaktion sind mehrere Gründe vorstellbar. Zum einen ist es denkbar, dass unter den gewählten basischen Bedingungen keine Interaktion zustande kam, weil SPI_{ac} die positive Ladung verloren hatte. Ein weiterer Grund könnte die zu geringe Wärmeänderung sein, die bei der Bindung von SPI_{ac} an SPI_p auftritt. Sollte jedoch keine Interaktion zwischen den beiden Molekülen bestehen, so wie die gegenwärtigen Ergebnisse nahelegen, wäre die gemeinsame Isolierung von SPI_p und SPI_{ac} aus dem Kulturüberstand von *S. mobaraensis* ein Artefakt und Ergebnis einer ähnlichen Adsorption beider Moleküle an das Säulenmaterial Fractogel EMD SO₃⁻.

4.3.3. Charakterisierung der SPI_p-MTG Interaktion

Im Rahmen der Strukturaufklärung des SPI_p wurde weiterhin die Lage der Glutamine sowie deren Eignung als Donor für die Vernetzung mit primären Aminen durch Transglutaminase untersucht. Über die Wechselwirkungen der MTG mit Substratproteinen, bei der keine stabilen Intermediate gebildet werden, war zu Beginn dieser Arbeit sehr wenig bekannt, insbesondere über die Art der Interaktion, die richtige Orientierung der Substratproteine, die strukturelle Adaption beider Proteine bei

Assoziation und Dissoziation nach erfolgter Vernetzung. Die Vernetzung wird über einen Acyltransfer zwischen Glutamin- und Lysindonorproteinen katalysiert, wobei sich energiereiche Thioester bilden, die in Gegenwart primärer Amine (z.B. proteingebundene Lysinreste) zerfallen. Nach Beschreibung der MTG-Struktur durch Kashiwagi *et al.* [50] wurde vorgeschlagen, dass reaktive Glutamine in einer hochflexiblen Proteinregion lokalisiert sein müssen, die aus kleinen Resten in der C-terminal flankierenden Sequenz des Glutamins besteht. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen zahlreicher Proteinsubstrate der MTG bestätigt, die eine Substraterkennung der MTG, ähnlich wie für Proteasen beschrieben, nahelegt. Dabei werden flexible, in der Regel ungefaltete Proteinsegmente für die Erkennung bevorzugt [88]. Kashiwagi und Kollegen schlugen vor, dass Glutamin-Donorproteine den Vorhof einer Seite der scheibenförmigen Enzymstruktur besetzen, während nach Bildung des Thioester-Intermediates das hintere Vestibül konformativ so eingestellt ist, dass Lysin-Donorproteine oder primäre Amine binden können [50]. Dieser vorgeschlagene Mechanismus wurde durch Mutagenesestudien gestützt, die den vorteilhaften Austausch von Aminosäuren im Frontvestibül der MTG für kleinere und hydrophobere Reste anzeigten [166]. Nachteil der Studie war die Verwendung des kleinen Substratpeptids Cbz-Gln-Gly, welches MTG-Varianten mit höherer Aktivität identifizierte, jedoch nicht die Kontaktflächen zwischen MTG und dem Substratprotein abbildete. Darüber hinaus wurden Peptid- und mRNA-Bibliotheken verwendet, um eine geeignete Substrat-Glutaminumgebung zu beschreiben [85, 166]. Während einige der erhaltenen Ergebnisse widersprüchlich waren, konnten diese Studien die Präferenz der MTG für hydrophobe Aminosäuren in der N-terminalen Sequenz des zentralen Glutaminrestes herausstellen. Diese Studien ließen jedoch die Frage offen, wie die Interaktion zwischen MTG und einem Proteinsubstrat gesteuert wird. Untersuchungen mit dem Dispase-Autolyse-induzierenden Protein (DAIP) gewährten erste Einblicke in die Interaktion der MTG mit einem natürlichen Substrat von *S. mobaraensis*. DAIP weist eine siebenblättrige Beta-Propeller-Struktur auf, in der vier von fünf Glutaminen eine gemeinsame Region des Proteins besiedeln und entsprechend bevorzugt markiert werden [82]. Der reaktivste Rest Gln39 liegt dabei in einer flexiblen Schleife, während das Biotinylierungspotential von Gln298 und Gln345 durch einen starren β -Turn oder geladene Aminosäuren in der Nachbarschaft beträchtlich reduziert ist (Abbildung 10). Im Vergleich zum DAIP weist SPI_p, wie eingangs beschrieben, eine ausgeprägte Doppel-Psi-Beta-Barrel-Domäne (DPBB) auf und zeigt so strukturell keine signifikante Übereinstimmung mit DAIP. SPI_p weist ebenfalls oberflächen-assoziierte Glutaminreste auf, von denen jedoch nur ein einziger Glutaminrest (Gln6) am starren keilförmigen N-Terminus der DPBB-Domäne Zugang für die MTG bietet. Die direkte Mikroumgebung des DAIP-Gln39 und SPI_p-Gln6 besteht größtenteils aus hydrophoben und neutralen Aminosäuren, welche die Annäherung und Wechselwirkung mit dem Frontvestibül der MTG begünstigen [50]. Als Störelement in der Mikroumgebung des SPI_p-Gln6 wirkte Lys7, welches die Markierbarkeit des Proteins deutlich absenkte. Die Substitution von Lys7 gegen Gly (Lys7Gly-Variante)

erhöhte den Amin-Einbau beträchtlich (13- bis 14-fach), wodurch nahezu die Markierungseffizienz des DAIP-Gln39 erreicht wurde. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit früheren Beobachtungen, bei denen kleine und hydrophobe Reste in direkter Nähe des Substrat-Glutamins die Vernetzung der Proteine begünstigen [50, 82]. Obwohl die Lys7Gly-Variante des SPI_p eine ähnlich intensive Markierung wie das Gln39 des DAIP nach 20 h aufwies, war die Geschwindigkeit der MTG-vermittelten Konjugation erheblich geringer. Damit liegt es nahe, dass die Gesamtaffinität der MTG für DAIP höher ist als die für SPI_p.

Im wässrigen Milieu wird die Anziehung von löslichen also weitgehend hydrophilen Polymeren über größere Distanzen hauptsächlich durch geladene Aminosäurereste bestimmt [223]. Die nach Kashiwagi *et al.* [50] potentielle Interaktionsfläche der scheibenförmigen MTG für Glutamin-Substrate (Frontvestibül) weist mindesten vier geladenen Bereiche auf, zwei saure (linke Seite von Cys64) und zwei basische (rechte Seite) Bereiche (Abbildung 7). Daher könnte die schnellere Biotinylierung durch stärkere Anziehungskräfte zwischen MTG und dem größeren DAIP im Vergleich mit SPI_p erklärt werden. Ein Protein-Protein-Docking von MTG und SPI_p mit dem ClusPro-Server des *Structural Bioinformatics* Labor der Universität Boston [167-171] identifizierte potentielle Interaktionsflächen, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen MTG und SPI_p beruhten. Die Untersuchung distinkter Kontaktpunkte erfolgte durch Ladungsumkehr der Aminosäurereste an der SPI_p-Oberfläche, die durch ortsgerichtete Mutagenese erreicht wurde. Dabei wurden entsprechend Lösungsmittel-exponierte SPI_p-Reste gegen Arginin bzw. Glutamat/Aspartat ausgetauscht. Es erfolgte immer nur eine Punktmutation, um die Struktur des SPI_p nicht zu stark zu verändern (Abbildung 48). Die Untersuchung der Biotinylierungseffizienz der generierten Varianten zeigte jedoch nicht das erwartete Verhalten. Die generierten Varianten hatten im Vergleich mit rek. wtSPI_p eine bis zu dreimal höhere Biotinylierungseffizienz und nicht, wie erwartet, eine Reduktion des Markierungsgrads. Die Ergebnisse legten nahe, dass eine Interaktion beider Moleküle nicht vornehmlich auf elektrostatischen Interaktionen beruht, sondern andere Kräfte die Interaktion steuern. Die auf Basis des *Docking*-Ergebnisses durchgeführten Experimente zeigten die heutigen Grenzen des Simulationsversuchs auf. Offensichtlich führte die Flexibilität beider Proteine und ihre besondere Fähigkeit zur gegenseitigen strukturellen Anpassung zur Fehlinterpretation der simulierten Interaktion. In ähnlicher Weise war es auch nicht möglich, den Einfluss ungeladener Aminosäuren an der Oberfläche des SPI_p zu untersuchen. Austausch verschiedener hydrophober AS gegen Arginin oder Glutamat/Aspartate führte zu keinem greifbaren Ergebnis (Tabelle 17, Abbildung 53). Statt der erwarteten Reduktion der Biotinylierungseffizienz wurde in den meisten Fällen eine verbesserte Biotinylierung erhalten. Lediglich die Varianten Thr9Arg, Ala40Arg sowie Ser61Glu zeigten eine um bis zu 45% reduzierte Biotinylierung (Tabelle 17, Abbildung 53).

Weiterführende Experimente, die die Kristallisation des binären MTG-SPI_p-Komplexes zum Ziel hatten schlugen fehl. Um dennoch die Lage und Interaktion eines MTG-Substrates im aktiven Zentrum beschreiben zu können, wurden ausgehend von DAIP (Gln39) und SPI_p (Gln6) MTG-Inhibitorpeptide abgeleitet und für eine Kokristallisation eingesetzt. Beide intrinsischen MTG-Substrate weisen neutrale und hydrophobe Aminosäuren stromaufwärts ihrer reaktiven Glutaminreste (DAIP-Gln39 und SPI_p-Gln6) auf (Tabelle 18) [82, 157]. Als Grundlage für die Peptide dienten die natürlichen AS-Sequenzen um die betreffenden Glutamine. Im Gegensatz zum vorhergesagten Nutzen einer positiven Ladung neben dem Glutamin [85] störte das in der Sequenz des wtSPI_p auftretende Lys7 die Wechselwirkung mit der MTG, die Biotinylierungseffizienz konnte jedoch durch Substitution gegen Glycin beträchtlich erhöht werden. Diese optimierte Sequenz wurde ebenfalls als Grundlage für ein Inhibitorpeptid (IP3) genutzt. Das inhibitorische Peptid auf Grundlage des wtSPI_p (IP2), das das N-terminale SPI_p-Segment nachahmt, führte schlussendlich zu auswertbaren Kokristallen mit der MTG und ermöglichte die Röntgenstrukturanalyse. Der Komplex simuliert den Bindungsmodus des SPI_p im aktiven Zentrum der MTG. Sechs von zehn IP2-Resten, umfassend Ile2 und Ile4 bis Met8, trugen hauptsächlich zur Wechselwirkung bei, während die terminalen Reste Asp1 und Thr9 / Gly10 flexibler zu sein scheinen und nicht mit dem Enzym in Kontakt treten (Abbildung 56). Von den sechs interagierenden Resten besetzten das kovalent gebundene Ser6 (OAS) sowie Ile4 und Gly5 den engen Spaltboden und zeigten Wechselwirkungen mit dem Enzymrückgrat. Im Gegensatz dazu ragten die verbleibenden Reste von IP2 fast senkrecht aus dem Boden und erhielten ihre Form durch hydrophobe Regionen in den MTG-Spaltwänden. Die spezifische Form der Wände führte höchstwahrscheinlich beide IP2-Termini in Richtung Frontvestibül der MTG. Bemerkenswerterweise wiesen im gebundenen IP2 die Aminosäuren OAS (Gln6 in SPI_p), Lys7 und Met8 geänderte Torsionswinkel im Vergleich mit SPI_p auf. IP2-Lys7 interagierte mit MTG über die hydrophoben Methylengruppen der Aminosäureseitenkette, während die positiv geladene Aminogruppe zu einer negativ geladenen Region der MTG (Asp3 / Asp4) ausgerichtet war. Eine solche Konfiguration könnte die vorteilhafte Wirkung von Arginin benachbart zu Glutamin in synthetischen Peptiden erklären, die über *Phage-Display*-Peptidbibliotheken identifiziert wurden [85].

Überträgt man die Orientierung des gebundenen IP2 im katalytischen Spalt der MTG auf Substratproteine, leiten sich daraus Auswirkungen für die Bindung von Glutamin-Donor-Proteinen an die MTG ab. Ist das zugängliche Glutamin Teil des Proteinterminus, ermöglicht eine IP2-ähnliche Ausrichtung des stromaufwärts (C-Terminus) oder stromabwärts gelegenen Peptids (N-Terminus) im katalytischen Spaltboden möglicherweise die Wechselwirkung des Substratproteins mit dem Frontvestibül der MTG (Abbildung 56). Die umgekehrte Positionierung, wie bei IP2 beobachtet, leitet jedoch das Hauptprotein zum Spalteingang (Abbildung 57). Befindet sich das reaktive Glutamin jedoch in einer flexiblen Schleife wie im Falle des DAIP-Gln39, ergeben sich zwei ähnliche

Orientierungswahrscheinlichkeiten. Eine Wechselwirkung des Substratproteins mit dem Frontvestibül ist nur denkbar, wenn beide Glutamin-flankierenden Peptide Seite an Seite aus dem Spaltboden der MTG herausragen. Die MTG-IP2-Struktur hat aber gezeigt, dass nur ein einziger Peptidstrang den Spaltboden besetzen kann. Um das vordere Vestibül zu erreichen, muss der andere Peptidstrang entsprechend das mit dem Spaltboden interagierende Peptid übersteigen. Demzufolge orientieren sich wesentliche Teile des Substratproteins wieder zum Spaltausgang der MTG, wahrscheinlich mit der Hauptausrichtung zum Frontvestibül.

Das ⁶SerLysMet⁸-Motiv des gebundenen Inhibitorpeptids IP2 wies beträchtliche Konformationsänderungen im Vergleich zum SPI_p auf. Bei der Überlagerung von MTG-gebundenem IP2 mit dem SPI_p-N-Terminus tritt eine umfangreiche Kollision von Teilen der DPBB-Domäne des SPI_p mit MTG auf (Abbildung 57). IP2-ähnliche Rotationen an den σ -Bindungen des SPI_p ⁵GlyGlnLysMet⁸-Rückgrats, insbesondere an Gly5, richten jedoch das Protein zur Mitte des MTG-Spalts aus, wodurch die Kollision des SPI_p mit der MTG-Spaltwand des aktiven Zentrums fast vollständig vermieden wird (Abbildung 58). Diese Konformationsänderungen des terminalen SPI_p-Peptids machen eine Ablösung des N-terminalen Peptids von der DPBB-Kerndomäne wahrscheinlich, die der Bindung an MTG vorausgeht. Sollte diese Annahme zutreffen, wäre SPI_p das erste bekannte Glutamin-Donorsubstrat, das wie die eukaryotische Transglutaminase 2 und der Blutgerinnungsfaktor XIII [224, 225] in einer geschlossenen und offenen Form auftritt (Abbildung 58).

Dementsprechend unterstützen die Orientierung des IP2 im aktiven Zentrum der MTG und die wahrscheinliche Ablösung des SPI_p-N-Terminus die Hypothese, dass MTG mehr eine selbst-assoziiierende Substratproteinschicht vernetzt, als einzelne Proteine in der bakteriellen Zellwand [55] (Abbildung 59). Die Interaktion von Glutamindonor-Substraten mit Aminosäuren des MTG-Frontvestibüls wie Trp59, Gln65, Tyr75 oder Thr77 [166] muss jedoch in Frage gestellt werden.

Die strukturelle Aufklärung der Positionierung eines Peptides im aktiven Zentrum der MTG, abgeleitet von einem intrinsischen MTG-Substrat bietet eine gute Grundlage für die Optimierung von MTG-Markierungsreaktionen und die Einführung von Markierungsstellen beispielsweise in therapeutische Proteine. Dabei können gezielt Markierungsstellen generiert werden, die eine spezifische Bindung der MTG und damit eine hohe Konjugationseffizienz ermöglichen, ohne dass nachteilige Konformationsänderungen eintreten.

5. Literaturverzeichnis

1. Anne, J. & Van Mellaert, L. (1993) Streptomyces lividans as host for heterologous protein production, *FEMS Microbiol Lett.* **114**, 121-8.
2. Stackebrandt, E. & Woese, C. R. (1984) The phylogeny of prokaryotes, *Microbiol Sci.* **1**, 117-22.
3. Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. & Rainey, F. A. (1997) Discrimination of Streptomyces albidoflavus strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers, *Int J Syst Bacteriol.* **47**, 202-6.
4. Chater, K. F., Biro, S., Lee, K. J., Palmer, T. & Schrempf, H. (2010) The complex extracellular biology of Streptomyces, *FEMS Microbiol Rev.* **34**, 171-98.
5. Omura, S. (1992) The expanded horizon for microbial metabolites--a review, *Gene.* **115**, 141-9.
6. Chater, K. F. (1972) A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of Streptomyces coelicolor, *J Gen Microbiol.* **72**, 9-28.
7. Donachie, W. D. (1993) The cell cycle of Escherichia coli, *Annu Rev Microbiol.* **47**, 199-230.
8. Wildermuth, H. & Hopwood, D. A. (1970) Septation during sporulation in Streptomyces coelicolor, *J Gen Microbiol.* **60**, 51-9.
9. Claessen, D., Rozen, D. E., Kuipers, O. P., Sogaard-Andersen, L. & van Wezel, G. P. (2014) Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies, *Nat Rev Microbiol.* **12**, 115-24.
10. Elliot, M. A., Buttner, M. J. und Nordwell, J. R. (2008) Multicellular development in Streptomyces., In: *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*, DE Whitworth, ed, Washington DC: American Society of Microbiolog, 419-438.
11. Bibb, M. J. (2005) Regulation of secondary metabolism in streptomycetes, *Curr Opin Microbiol.* **8**, 208-15.
12. van Wezel, G. P. & McDowall, K. J. (2011) The regulation of the secondary metabolism of Streptomyces: new links and experimental advances, *Nat Prod Rep.* **28**, 1311-33.
13. Mendez, C., Brana, A. F., Manzanal, M. B. & Hardisson, C. (1985) Role of substrate mycelium in colony development in Streptomyces, *Can J Microbiol.* **31**, 446-50.
14. Wildermuth, H. (1970) Development and organization of the aerial mycelium in Streptomyces coelicolor, *J Gen Microbiol.* **60**, 43-50.
15. Fernandez, M. & Sanchez, J. (2002) Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of Streptomyces antibioticus ETH 7451, *Microbiology.* **148**, 405-12.
16. Rigali, S., Nothhaft, H., Noens, E. E., Schlicht, M., Colson, S., Muller, M., Joris, B., Koerten, H. K., Hopwood, D. A., Titgemeyer, F. & van Wezel, G. P. (2006) The sugar phosphotransferase system of Streptomyces coelicolor is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development, *Mol Microbiol.* **61**, 1237-51.

17. Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A. & van Wezel, G. P. (2008) Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*, *EMBO Rep.* **9**, 670-5.
18. Manteca, A., Ye, J., Sanchez, J. & Jensen, O. N. (2011) Phosphoproteome analysis of *Streptomyces* development reveals extensive protein phosphorylation accompanying bacterial differentiation, *J Proteome Res.* **10**, 5481-92.
19. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clement, C., Ouhdouch, Y. & van Wezel, G. P. (2016) Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria, *Microbiol Mol Biol Rev.* **80**, 1-43.
20. Daza, A., Martin, J. F., Dominguez, A. & Gil, J. A. (1989) Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift, *J Gen Microbiol.* **135**, 2483-91.
21. Chater, K. F. (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*, *Annu Rev Microbiol.* **47**, 685-713.
22. Kalakoutskii, L. V. & Agre, N. S. (1976) Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes, *Bacteriol Rev.* **40**, 469-524.
23. Kendrick, K. E. & Ensign, J. C. (1983) Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture, *J Bacteriol.* **155**, 357-66.
24. Novella, I. S., Barbes, C. & Sanchez, J. (1992) Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture, *Can J Microbiol.* **38**, 769-73.
25. Rueda, B., Miguelez, E. M., Hardisson, C. & Manzanal, M. B. (2001) Mycelial differentiation and spore formation by *Streptomyces brasiliensis* in submerged culture, *Can J Microbiol.* **47**, 1042-7.
26. Baldicci, E. (1958) Genus *Streptoverticillium*., *Bergey's Manual of systematic bacteriology.* **2**.
27. Witt, D. S., E. (1990) Unification of the Genera *Streptoverticillum* and *Streptomyces*, and Amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL, *Systematic and Applied Microbiology.* **13**, 361-371.
28. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D. A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Nature.* **417**, 141-7.
29. Hahn, M. Y., Bae, J. B., Park, J. H. & Roe, J. H. (2003) Isolation and characterization of *Streptomyces coelicolor* RNA polymerase, its sigma, and antisigma factors, *Methods Enzymol.* **370**, 73-82.
30. Zindel, S. (2013) Struktur und Funktion enzymatisch vernetzbarer Proteaseinhibitoren von *Streptomyces mobaraensis*, *Dissertation.*

31. Yang, H., He, T., Wu, W., Zhu, W., Lu, B. & Sun, W. (2013) Whole-Genome Shotgun Assembly and Analysis of the Genome of *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847, a Strain for Industrial Production of Microbial Transglutaminase, *Genome Announc.* **1**, e0014313.
32. Jarosz, B. J. (2006) Measurement of safe thermal therapy levels: the case of ultrasonic waveguide interstitial applicator array, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* **1**, 5025-8.
33. Martins, I. M., Matos, M., Costa, R., Silva, F., Pascoal, A., Estevinho, L. M. & Choupina, A. B. (2014) Transglutaminases: recent achievements and new sources, *Appl Microbiol Biotechnol.* **98**, 6957-64.
34. Makarova, K. S., Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999) A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases, *Protein Sci.* **8**, 1714-9.
35. Carvajal, P., Gibert, J., Campos, N., Lopera, O., Barbera, E., Torne, J. M. & Santos, M. (2011) Activity of maize transglutaminase overexpressed in *Escherichia coli* inclusion bodies: an alternative to protein refolding, *Biotechnol Prog.* **27**, 232-40.
36. Griffin, M., Casadio, R. & Bergamini, C. M. (2002) Transglutaminases: nature's biological glues, *Biochem J.* **368**, 377-96.
37. Greenberg, C. S., Birckbichler, P. J. & Rice, R. H. (1991) Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues, *FASEB J.* **5**, 3071-7.
38. Akimov, S. S., Krylov, D., Fleischman, L. F. & Belkin, A. M. (2000) Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin, *J Cell Biol.* **148**, 825-38.
39. Zemskov, E. A., Janiak, A., Hang, J., Waghray, A. & Belkin, A. M. (2006) The role of tissue transglutaminase in cell-matrix interactions, *Front Biosci.* **11**, 1057-76.
40. Rose, D. M., Sydlaske, A. D., Agha-Babakhani, A., Johnson, K. & Terkeltaub, R. (2006) Transglutaminase 2 limits murine peritoneal acute gout-like inflammation by regulating macrophage clearance of apoptotic neutrophils, *Arthritis Rheum.* **54**, 3363-71.
41. Agnihotri, N., Kumar, S. & Mehta, K. (2013) Tissue transglutaminase as a central mediator in inflammation-induced progression of breast cancer, *Breast Cancer Res.* **15**, 202.
42. Klock, C., Diraimondo, T. R. & Khosla, C. (2012) Role of transglutaminase 2 in celiac disease pathogenesis, *Semin Immunopathol.* **34**, 513-22.
43. Ikura, K., Nasu, T., Yokota, H., Sasaki, R., Chiba, H. (1987) Cloning of cDNA coding for guinea pig liver transglutaminase., *Agric Biol Chem.* **51**, 957-961.
44. Klein, J. D., Guzman, E. & Kuehn, G. D. (1992) Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*, *J Bacteriol.* **174**, 2599-605.
45. Singh, R. N., Chandrashekar, R. & Mehta, K. (1995) Purification and partial characterization of a transglutaminase from dog filarial parasite, *Dirofilaria immitis*, *Int J Biochem Cell Biol.* **27**, 1285-91.
46. Singh, R. N., McQueen, T. & Mehta, K. (1995) Detection of the amine acceptor protein substrates of transglutaminase with 5-(biotinamido) pentylamine, *Anal Biochem.* **231**, 261-3.

-
47. Kang, H. & Cho, Y. D. (1996) Purification and properties of transglutaminase from soybean (*Glycine max*) leaves, *Biochem Biophys Res Commun.* **223**, 288-92.
 48. Yasueda, H., Nakanishi, K., Kumazawa, Y., Nagase, K., Motoki, M. & Matsui, H. (1995) Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*, *Eur J Biochem.* **232**, 411-9.
 49. Ohtsuka T., U. Y., Nio N., Kubota K. (2001) Comparison of Deamidation Activity of Transglutaminases, *Journal of Food Science.* **66**, 25-29.
 50. Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. & Suzuki, E. (2002) Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*, *J Biol Chem.* **277**, 44252-60.
 51. Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. & Motoki, M. (1989) Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms., *Agric Biol Chem.* **53**, 2613-261.
 52. Duran, R., Junqua, M., Schmitter, J. M., Gancet, C. & Goulas, P. (1998) Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptoverticillium cinnamomeum* CBS 683.68, *Biochimie.* **80**, 313-9.
 53. Pasternack, R. (1998) Mikrobielle Transglutaminasen von *Streptoverticillium* speizes: Nachweis, Charakterisierung und Regulationsmechanismus der Enzyme, *Dissertation*.
 54. Suzuki, S., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, S., Kubota, K. & Yokozeki, K. (2000) Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores, *Biosci Biotechnol Biochem.* **64**, 2344-51.
 55. Sarafeddin, A., Arif, A., Peters, A. & Fuchsbaue, H. L. (2011) A novel transglutaminase substrate from *Streptomyces mobaraensis* inhibiting papain-like cysteine proteases, *J Microbiol Biotechnol.* **21**, 617-26.
 56. Sakamoto, H., Nonaka, M. & Motoki, M. (1994) Calcium-independent transglutaminase derived from a microorganism: its characteristics and capability in protein crosslinking and gel formation., *Food Hydrocolloids: Structures, properties, and functions*, Plenum Press, New York, 383-386.
 57. Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M. & Shimonishi, Y. (1993) Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112, *J Biol Chem.* **268**, 11565-72.
 58. Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Hirose, S., Matsuura, A., Takagi, H., Motoki, M. & Takeuchi, K. (1994) Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*, *Biosci Biotechnol Biochem.* **58**, 82-7.
 59. Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J. T., Robenek, I. R., Wolf, S. & Fuchsbaue, H. L. (1998) Bacterial pro-transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*--purification, characterisation and sequence of the zymogen, *Eur J Biochem.* **257**, 570-6.
 60. Economou, A. (1999) Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway, *Trends Microbiol.* **7**, 315-20.
 61. Simonen, M. & Palva, I. (1993) Protein secretion in *Bacillus* species, *Microbiol Rev.* **57**, 109-37.

62. Nakamura, K., Yahagi, S., Yamazaki, T. & Yamane, K. (1999) Bacillus subtilis histone-like protein, HBSu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the Alu domain of small cytoplasmic RNA, *J Biol Chem.* **274**, 13569-76.
63. van Roosmalen, M. L., Geukens, N., Jongbloed, J. D., Tjalsma, H., Dubois, J. Y., Bron, S., van Dijl, J. M. & Anne, J. (2004) Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria, *Biochim Biophys Acta.* **1694**, 279-97.
64. Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & Meyer, T. F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of Neisseria gonorrhoeae IgA protease, *Nature.* **325**, 458-62.
65. Terada, I., Kwon, S. T., Miyata, Y., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1990) Unique precursor structure of an extracellular protease, aqualysin I, with NH₂- and COOH-terminal pro-sequences and its processing in Escherichia coli, *J Biol Chem.* **265**, 6576-81.
66. Wandersman, C. (1989) Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases, *Mol Microbiol.* **3**, 1825-31.
67. Ohta, Y. & Inouye, M. (1990) Pro-subtilisin E: purification and characterization of its autoprocessing to active subtilisin E in vitro, *Mol Microbiol.* **4**, 295-304.
68. Baker, D., Shiau, A. K. & Agard, D. A. (1993) The role of pro regions in protein folding, *Curr Opin Cell Biol.* **5**, 966-70.
69. Demleitner, G. & Gotz, F. (1994) Evidence for importance of the Staphylococcus hyicus lipase pro-peptide in lipase secretion, stability and activity, *FEMS Microbiol Lett.* **121**, 189-97.
70. Navarre, W. W. & Schneewind, O. (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**, 174-229.
71. Fu, X., Inouye, M. & Shinde, U. (2000) Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked, *J Biol Chem.* **275**, 16871-8.
72. Zotzel, J., Keller, P. & Fuchsbauer, H. L. (2003) Transglutaminase from Streptomyces mobaraensis is activated by an endogenous metalloprotease, *Eur J Biochem.* **270**, 3214-22.
73. Tsuyuki, H., Kajiwar, K., Fujita, A., Kumazaki, T. & Ishii, S. (1991) Purification and characterization of Streptomyces griseus metalloendopeptidases I and II, *J Biochem.* **110**, 339-44.
74. Kumazaki, T., Ishii, S. & Yokosawa, H. (1994) Inhibition of Streptomyces griseus metalloendopeptidase II (SGMP-II) by active-site-directed inhibitors, *J Biochem.* **115**, 532-5.
75. Kojima, S., Kumazaki, T., Ishii, S. & Miura, K. (1998) Primary structure of Streptomyces griseus metalloendopeptidase II, *Biosci Biotechnol Biochem.* **62**, 1392-8.
76. Kuramoto, A., Lezhava, A., Taguchi, S., Momose, H. & Kinashi, H. (1996) The location and deletion of the genes which code for SSI-like protease inhibitors in Streptomyces species, *FEMS Microbiol Lett.* **139**, 37-42.
77. Hirano, S., Kato, J. Y., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2006) Control of the Streptomyces Subtilisin inhibitor gene by AdpA in the A-factor regulatory cascade in Streptomyces griseus, *J Bacteriol.* **188**, 6207-16.

-
78. Zotzel, J., Pasternack, R., Pelzer, C., Ziegert, D., Mainusch, M. & Fuchsbauer, H. L. (2003) Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step, *Eur J Biochem.* **270**, 4149-55.
79. Umezawa, Y., Yokoyama, K., Kikuchi, Y., Date, M., Ito, K., Yoshimoto, T. & Matsui, H. (2004) Novel prolyl tri/tetra-peptidyl aminopeptidase from *Streptomyces mobaraensis*: substrate specificity and enzyme gene cloning, *J Biochem.* **136**, 293-300.
80. Yang, M. T., Chang, C. H., Wang, J. M., Wu, T. K., Wang, Y. K., Chang, C. Y. & Li, T. T. (2011) Crystal structure and inhibition studies of transglutaminase from *Streptomyces mobaraense*, *J Biol Chem.* **286**, 7301-7.
81. Strop, P. (2014) Versatility of microbial transglutaminase, *Bioconjug Chem.* **25**, 855-62.
82. Fiebig, D., Schmelz, S., Zindel, S., Ehret, V., Beck, J., Ebenig, A., Ehret, M., Frols, S., Pfeifer, F., Kolmar, H., Fuchsbauer, H. L. & Scrima, A. (2016) Structure of the Dispa Autolysis-inducing Protein from *Streptomyces mobaraensis* and Glutamine Cross-linking Sites for Transglutaminase, *J Biol Chem.* **291**, 20417-26.
83. Shimba, N., Yokoyama, K. & Suzuki, E. (2002) NMR-based screening method for transglutaminases: rapid analysis of their substrate specificities and reaction rates, *J Agric Food Chem.* **50**, 1330-4.
84. Ohtsuka, T., Ota, M., Nio, N. & Motoki, M. (2000) Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors, *Biosci Biotechnol Biochem.* **64**, 2608-13.
85. Sugimura, Y., Yokoyama, K., Nio, N., Maki, M. & Hitomi, K. (2008) Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library, *Arch Biochem Biophys.* **477**, 379-83.
86. Lee, J. H., Song, C., Kim, D. H., Park, I. H., Lee, S. G., Lee, Y. S. & Kim, B. G. (2013) Glutamine (Q)-peptide screening for transglutaminase reaction using mRNA display, *Biotechnol Bioeng.* **110**, 353-62.
87. Siegmund, V., Schmelz, S., Dickgiesser, S., Beck, J., Ebenig, A., Fittler, H., Frauendorf, H., Piater, B., Betz, U. A., Avrutina, O., Scrima, A., Fuchsbauer, H. L. & Kolmar, H. (2015) Locked by Design: A Conformationally Constrained Transglutaminase Tag Enables Efficient Site-Specific Conjugation, *Angew Chem Int Ed Engl.*
88. Fontana, A., Spolaore, B., Mero, A. & Veronese, F. M. (2008) Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase, *Adv Drug Deliv Rev.* **60**, 13-28.
89. Schmidt, S., Adolf, F. & Fuchsbauer, H. L. (2008) The transglutaminase activating metalloprotease inhibitor from *Streptomyces mobaraensis* is a glutamine and lysine donor substrate of the intrinsic transglutaminase, *FEBS Lett.* **582**, 3132-8.
90. Sarafeddinov, A., Schmidt, S., Adolf, F., Mainusch, M., Bender, A. & Fuchsbauer, H. L. (2009) A novel transglutaminase substrate from *Streptomyces mobaraensis* triggers autolysis of neutral metalloproteases, *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 993-9.

-
91. Ikenaka, T., Odani, S., Sakai, M., Nabeshima, Y., Sato, S. & Murao, S. (1974) Amino acid sequence of an alkaline proteinase inhibitor (Streptomyces subtilisin inhibitor) from Streptomyces albogriseolus S-3253, *J Biochem.* **76**, 1191-209.
 92. Kojima, S., Nishiyama, Y., Kumagai, I. & Miura, K. (1991) Inhibition of subtilisin BPN' by reaction site P1 mutants of Streptomyces subtilisin inhibitor, *J Biochem.* **109**, 377-82.
 93. Mitsui, Y., Satow, Y., Watanabe, Y., Hirono, S. & Iitaka, Y. (1979) Crystal structures of Streptomyces subtilisin inhibitor and its complex with subtilisin BPN', *Nature.* **277**, 447-52.
 94. Kumazaki, T., Kajiwar, K., Kojima, S., Miura, K. & Ishii, S. (1993) Interaction of Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI) with Streptomyces griseus metallo-endopeptidase II (SGMP II), *J Biochem.* **114**, 570-5.
 95. Hiraga, K., Suzuki, T. & Oda, K. (2000) A novel double-headed proteinaceous inhibitor for metalloproteinase and serine proteinase, *J Biol Chem.* **275**, 25173-9.
 96. Zindel, S., Kaman, W. E., Frols, S., Pfeifer, F., Peters, A., Hays, J. P. & Fuchsbaue, H. L. (2013) The papain inhibitor (SPI) of Streptomyces mobaraensis inhibits bacterial cysteine proteases and is an antagonist of bacterial growth, *Antimicrob Agents Chemother.* **57**, 3388-91.
 97. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51 Pt 1**, 263-73.
 98. Bryksin, A. V. & Matsumura, I. (2010) Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids, *Biotechniques.* **48**, 463-5.
 99. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids, *Gene.* **96**, 23-8.
 100. Froger, A. & Hall, J. E. (2007) Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method, *J Vis Exp*, 253.
 101. Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D. & Hochstrasser, D. F. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server, *Methods Mol Biol.* **112**, 531-52.
 102. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* **227**, 680-5.
 103. Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T. & Ferdinandy, P. (2010) Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography, *J Pharmacol Toxicol Methods.* **61**, 205-9.
 104. Frankowski, H., Gu, Y. H., Heo, J. H., Milner, R. & Del Zoppo, G. J. (2012) Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures, *Methods Mol Biol.* **814**, 221-33.
 105. Lantz, M. S. & Ciborowski, P. (1994) Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases, *Methods Enzymol.* **235**, 563-94.
 106. Raser, K. J., Posner, A. & Wang, K. K. (1995) Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents, *Arch Biochem Biophys.* **319**, 211-6.

107. Snoek-van Beurden, P. A. & Von den Hoff, J. W. (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Biotechniques*. **38**, 73-83.
108. Troeberg, L. & Nagase, H. (2004) Zymography of metalloproteinases, *Curr Protoc Protein Sci*. **Chapter 21**, Unit 21 15.
109. Zotzel, J. (2002) Aktivierung von Transglutaminase von *Streptomyces mobaraensis* und ihre Regulation, *Dissertation*.
110. Martin, L. S., S.; Breitschprecher, D. (2014) Analyzing Thermal Unfolding of Proteins: The Prometheus NT.48., *Application Note NanoTemper Technologies*.
111. Alexander, C. G., Wanner, R., Johnson, C. M., Breitsprecher, D., Winter, G., Duhr, S., Baaske, P. & Ferguson, N. (2014) Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings, *Biochim Biophys Acta*. **1844**, 2241-50.
112. Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., Ji, X. L. & Liu, S. Q. (2016) Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods, *Int J Mol Sci*. **17**.
113. Todd, M. J. & Gomez, J. (2001) Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity?, *Anal Biochem*. **296**, 179-87.
114. Transtrum, M. K., Hansen, L. D. & Quinn, C. (2015) Enzyme kinetics determined by single-injection isothermal titration calorimetry, *Methods*. **76**, 194-200.
115. Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950) The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine, *J Biol Chem*. **187**, 111-25.
116. Lorand, L., Lockridge, O. M., Campbell, L. K., Myhrman, R. & Bruner-Lorand, J. (1971) Transamidating enzymes. II. A continuous fluorescent method suited for automating measurements of factor XIII in plasma, *Anal Biochem*. **44**, 221-31.
117. Weimer, S., Oertel, K. & Fuchsbaue, H. L. (2006) A quenched fluorescent dipeptide for assaying dispa- and thermolysin-like proteases, *Anal Biochem*. **352**, 110-9.
118. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**, 4350-4.
119. Najjar, V. A. M., R.B. (1966) Solid Phase Peptide Synthesis-The Use of the o- Nitrophenylsulfonyl Group in the Synthesis of the Octadecapeptide Bradykininylbradykinin., *Biochemistry*.
120. Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J. & Studier, F. W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase, *Gene*. **56**, 125-35.
121. Studier, F. W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system, *J Mol Biol*. **219**, 37-44.
122. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J Mol Biol*. **189**, 113-30.
123. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol*. **185**, 60-89.

-
124. Wetmore, D. R., Wong, S. L. & Roche, R. S. (1992) The role of the pro-sequence in the processing and secretion of the thermolysin-like neutral protease from *Bacillus cereus*, *Mol Microbiol.* **6**, 1593-604.
 125. Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A. & Roques, B. P. (1999) The prosequence of thermolysin acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in *Escherichia coli*, *J Mol Biol.* **285**, 1911-5.
 126. Tang, B., Nirasawa, S., Kitaoka, M., Marie-Claire, C. & Hayashi, K. (2003) General function of N-terminal propeptide on assisting protein folding and inhibiting catalytic activity based on observations with a chimeric thermolysin-like protease, *Biochem Biophys Res Commun.* **301**, 1093-8.
 127. Takagi, M. I., T. (1989) Role of the pre-pro-region of neutral protease in secretion in *Bacillus subtilis*, *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **67**, 71-76.
 128. Veltman, O. R., Vriend, G., Berendsen, H. J., Van den Burg, B., Venema, G. & Eijssink, V. G. (1998) A single calcium binding site is crucial for the calcium-dependent thermal stability of thermolysin-like proteases, *Biochemistry.* **37**, 5312-9.
 129. Ruf, A., Stihle, M., Benz, J., Schmidt, M. & Sobek, H. (2013) Structure of gentlyase, the neutral metalloprotease of *Paenibacillus polymyxa*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **69**, 24-31.
 130. Holland, D. R., Hausrath, A. C., Juers, D. & Matthews, B. W. (1995) Structural analysis of zinc substitutions in the active site of thermolysin, *Protein Sci.* **4**, 1955-65.
 131. Marx, C. K., Hertel, T. C. & Pietzsch, M. (2007) Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*, *Enzyme and Microbial Technology.* **40**, 1543-1550.
 132. Pfeleiderer, C., Mainusch, M., Weber, J., Hils, M. & Fuchsbauer, H. L. (2005) Inhibition of bacterial transglutaminase by its heat-treated pro-enzyme, *Microbiol Res.* **160**, 265-71.
 133. Takeuchi, Y., Satow, Y., Nakamura, K. T. & Mitsui, Y. (1991) Refined crystal structure of the complex of subtilisin BPN' and *Streptomyces* subtilisin inhibitor at 1.8 Å resolution, *J Mol Biol.* **221**, 309-25.
 134. Nonaka, T., Suzuki, T., Tanaka, N., Saito, S., Senda, T., Miura, K. & Mitsui, Y. (1996) Structure and function of subtilisin BPN' as studied through crystallographic studies on a series of its complexes with genetically engineered proteinaceous inhibitor SSI, *Adv Exp Med Biol.* **379**, 21-7.
 135. Kojima, S., Obata, S., Kumagai, I. & Miura, K. (1990) Alteration of the specificity of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor by gene engineering, *Biotechnology (N Y).* **8**, 449-52.
 136. Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nat Methods.* **8**, 785-6.
 137. Kojima, S., Kumagai, I. & Miura, K. (1993) Requirement for a disulfide bridge near the reactive site of protease inhibitor SSI (*Streptomyces* subtilisin inhibitor) for its inhibitory action, *J Mol Biol.* **230**, 395-9.
 138. Kojima, S., Furukubo, S., Kumagai, I. & Miura, K. (1993) Effects of deletion in the flexible loop of the protease inhibitor SSI (*Streptomyces* subtilisin inhibitor) on interactions with proteases, *Protein Eng.* **6**, 297-303.

-
139. Suda, H., Aoyagi, T., Hamada, M., Takeuchi, T. & Umezawa, H. (1972) Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes, *J Antibiot (Tokyo)*. **25**, 263-6.
140. Umezawa, S., Tatsuta, K., Fujimoto, K., Tsuchiya, T. & Umezawa, H. (1972) Structure of antipain, a new Sakaguchi-positive product of streptomyces, *J Antibiot (Tokyo)*. **25**, 267-70.
141. Westerik, J. O. & Wolfenden, R. (1972) Aldehydes as inhibitors of papain, *J Biol Chem*. **247**, 8195-7.
142. Nakae, K., Kojima, F., Sawa, R., Kubota, Y., Igarashi, M., Kinoshita, N., Adachi, H., Nishimura, Y. & Akamatsu, Y. (2010) Antipain Y, a new antipain analog that inhibits neurotransmitter release from rat dorsal root ganglion neurons, *J Antibiot (Tokyo)*. **63**, 41-4.
143. Kadowaki, T., Kitano, S., Baba, A., Takii, R., Hashimoto, M., Katunuma, N. & Yamamoto, K. (2003) Isolation and characterization of a novel and potent inhibitor of Arg-gingipain from *Streptomyces* sp. strain FA-70, *Biol Chem*. **384**, 911-20.
144. Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Kunimoto, S. & Matsuzaki, M. (1970) Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes, *J Antibiot (Tokyo)*. **23**, 425-7.
145. Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, A., Kawamura, K. & Kondo, S. (1969) Leupeptins, new protease inhibitors from Actinomycetes, *J Antibiot (Tokyo)*. **22**, 283-6.
146. Schroder, E., Phillips, C., Garman, E., Harlos, K. & Crawford, C. (1993) X-ray crystallographic structure of a papain-leupeptin complex, *FEBS Lett*. **315**, 38-42.
147. Schultz, R. M., Varma-Nelson, P., Ortiz, R., Kozlowski, K. A., Orawski, A. T., Pagast, P. & Frankfater, A. (1989) Active and inactive forms of the transition-state analog protease inhibitor leupeptin: explanation of the observed slow binding of leupeptin to cathepsin B and papain, *J Biol Chem*. **264**, 1497-507.
148. Schultz, R. M. & Cheerva, A. C. (1975) The binding of a non-specific "transition state analogue" to alpha-chymotrypsin, *FEBS Lett*. **50**, 47-9.
149. Berger, A. & Schechter, I. (1970) Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **257**, 249-64.
150. Drenth, J., Kalk, K. H. & Swen, H. M. (1976) Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain, *Biochemistry*. **15**, 3731-8.
151. Varughese, K. I., Ahmed, F. R., Carey, P. R., Hasnain, S., Huber, C. P. & Storer, A. C. (1989) Crystal structure of a papain-E-64 complex, *Biochemistry*. **28**, 1330-2.
152. Yamamoto, D., Ishida, T. & Inoue, M. (1990) A comparison between the binding modes of a substrate and inhibitor to papain as observed in complex crystal structures, *Biochem Biophys Res Commun*. **171**, 711-6.
153. Kim, M. J., Yamamoto, D., Matsumoto, K., Inoue, M., Ishida, T., Mizuno, H., Sumiya, S. & Kitamura, K. (1992) Crystal structure of papain-E64-c complex. Binding diversity of E64-c to papain S2 and S3 subsites, *Biochem J*. **287** (Pt 3), 797-803.
154. Laskowski, R. A. & Swindells, M. B. (2011) LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery, *J Chem Inf Model*. **51**, 2778-86.

155. Waldron, T. T. & Murphy, K. P. (2003) Stabilization of proteins by ligand binding: application to drug screening and determination of unfolding energetics, *Biochemistry*. **42**, 5058-64.
156. Cimperman, P., Baranauskiene, L., Jachimoviciute, S., Jachno, J., Torresan, J., Michailoviene, V., Matulienė, J., Sereikaite, J., Bumelis, V. & Matulis, D. (2008) A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands, *Biophys J*. **95**, 3222-31.
157. Juettner, N. E., Schmelz, S., Bogen, J. P., Happel, D., Fessner, W. D., Pfeifer, F., Fuchsbauer, H. L. & Scrima, A. (2018) Illuminating structure and acyl donor sites of a physiological transglutaminase substrate from *Streptomyces mobaraensis*, *Protein Sci*.
158. Ludvigsen, S. & Poulsen, F. M. (1992) Three-dimensional structure in solution of barwin, a protein from barley seed, *Biochemistry*. **31**, 8783-9.
159. Davies, G. J., Dodson, G. G., Hubbard, R. E., Tolley, S. P., Dauter, Z., Wilson, K. S., Hjort, C., Mikkelsen, J. M., Rasmussen, G. & Schulein, M. (1993) Structure and function of endoglucanase V, *Nature*. **365**, 362-4.
160. Jorgenson, M. A., Chen, Y., Yahashiri, A., Popham, D. L. & Weiss, D. S. (2014) The bacterial septal ring protein RlpA is a lytic transglycosylase that contributes to rod shape and daughter cell separation in *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol Microbiol*. **93**, 113-28.
161. Castillo, R. M., Mizuguchi, K., Dhanaraj, V., Albert, A., Blundell, T. L. & Murzin, A. G. (1999) A six-stranded double-psi beta barrel is shared by several protein superfamilies, *Structure*. **7**, 227-36.
162. Coles, M., Diercks, T., Liermann, J., Groger, A., Rockel, B., Baumeister, W., Koretke, K. K., Lupas, A., Peters, J. & Kessler, H. (1999) The solution structure of VAT-N reveals a 'missing link' in the evolution of complex enzymes from a simple betaalpha-beta element, *Curr Biol*. **9**, 1158-68.
163. Coles, M., Hulko, M., Djuranovic, S., Truffault, V., Koretke, K., Martin, J. & Lupas, A. N. (2006) Common evolutionary origin of swapped-hairpin and double-psi beta barrels, *Structure*. **14**, 1489-98.
164. Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers*. **22**, 2577-637.
165. Touw, W. G., Baakman, C., Black, J., te Beek, T. A., Krieger, E., Joosten, R. P. & Vriend, G. (2015) A series of PDB-related databanks for everyday needs, *Nucleic Acids Res*. **43**, D364-8.
166. Yokoyama, K., Utsumi, H., Nakamura, T., Ogaya, D., Shimba, N., Suzuki, E. & Taguchi, S. (2010) Screening for improved activity of a transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* created by a novel rational mutagenesis and random mutagenesis, *Appl Microbiol Biotechnol*. **87**, 2087-96.
167. Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S. & Camacho, C. J. (2004) ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking, *Nucleic Acids Res*. **32**, W96-9.
168. Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R. & Vajda, S. (2006) PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials, *Proteins*. **65**, 392-406.
169. Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R. & Vajda, S. (2013) How good is automated protein docking?, *Proteins*. **81**, 2159-66.

-
170. Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D. & Vajda, S. (2017) The ClusPro web server for protein-protein docking, *Nat Protoc.* **12**, 255-278.
171. Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S. & Camacho, C. J. (2004) ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes, *Bioinformatics.* **20**, 45-50.
172. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, *Nat Protoc.* **10**, 845-58.
173. Juettner, N. E., Schmelz, S., Kraemer, A., Knapp, S., Becker, B., Kolmar, H., Scrima, A. & Fuchsbaue, H. L. (2018) Structure of a glutamine donor mimicking inhibitory peptide shaped by the catalytic cleft of microbial transglutaminase, *FEBS J.*
174. Pettinger, J., Jones, K. & Cheeseman, M. D. (2017) Lysine-Targeting Covalent Inhibitors, *Angew Chem Int Ed Engl.* **56**, 15200-15209.
175. Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J. & Steiner, D. F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases, *J Biol Chem.* **273**, 11107-14.
176. Lipkind, G. M., Zhou, A. & Steiner, D. F. (1998) A model for the structure of the P domains in the subtilisin-like prohormone convertases, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 7310-5.
177. Rovere, C., Luis, J., Lissitzky, J. C., Basak, A., Marvaldi, J., Chretien, M. & Seidah, N. G. (1999) The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin $\alpha 5 \beta 1$, *J Biol Chem.* **274**, 12461-7.
178. Lusson, J., Benjannet, S., Hamelin, J., Savaria, D., Chretien, M. & Seidah, N. G. (1997) The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking, *Biochem J.* **326 (Pt 3)**, 737-44.
179. Jeger, S., Zimmermann, K., Blanc, A., Grunberg, J., Honer, M., Hunziker, P., Struthers, H. & Schibli, R. (2010) Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase, *Angew Chem Int Ed Engl.* **49**, 9995-7.
180. Dennler, P., Chiotellis, A., Fischer, E., Bregeon, D., Belmant, C., Gauthier, L., Lhospice, F., Romagne, F. & Schibli, R. (2014) Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates, *Bioconjug Chem.* **25**, 569-78.
181. Xu, Z., Wang, Y., Chater, K. F., Ou, H. Y., Xu, H. H., Deng, Z. & Tao, M. (2017) Large-Scale Transposition Mutagenesis of *Streptomyces coelicolor* Identifies Hundreds of Genes Influencing Antibiotic Biosynthesis, *Appl Environ Microbiol.* **83**.
182. Takehana, S., Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Takeuchi, K., Matsui, H., Motoki, M. & Takagi, H. (1994) Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Escherichia coli*, *Biosci Biotechnol Biochem.* **58**, 88-92.
183. Taguchi, S., Arakawa, K., Yokoyama, K., Takehana, S., Takagi, H. & Momose, H. (2002) Overexpression and purification of microbial pro-transglutaminase from *Streptomyces cinnamomeum* and in vitro processing by *Streptomyces albogriseolus* proteases, *J Biosci Bioeng.* **94**, 478-81.

-
184. Yang, H. L., Pan, L. & Lin, Y. (2009) Purification and on-column activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *Escherichia coli*, *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 2531-4.
185. Sommer, C., Hertel, T. C., Schmelzer, C. E. & Pietzsch, M. (2012) Investigations on the activation of recombinant microbial pro-transglutaminase: in contrast to proteinase K, dispase removes the histidine-tag, *Amino Acids.* **42**, 997-1006.
186. Nicieza, R. G., Huergo, J., Connolly, B. A. & Sanchez, J. (1999) Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation. Analogies with the biochemical processes described in late steps of eukaryotic apoptosis, *J Biol Chem.* **274**, 20366-75.
187. Valbuzzi, A., Ferrari, E. & Albertini, A. M. (1999) A novel member of the subtilisin-like protease family from *Bacillus subtilis*, *Microbiology.* **145 (Pt 11)**, 3121-7.
188. Bajorath, J., Saenger, W. & Pal, G. P. (1988) Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album Limber*, *Biochim Biophys Acta.* **954**, 176-82.
189. Hausdorf, G., Kruger, K. & Hohne, W. E. (1980) Thermitase, a thermostable serine protease from *Thermoactinomyces vulgaris*. Classification as a subtilisin-type protease, *Int J Pept Protein Res.* **15**, 420-9.
190. Terabe, M., Kojima, S., Taguchi, S., Momose, H. & Miura, K. (1996) New subtilisin-trypsin inhibitors produced by *Streptomyces*: primary structures and their relationship to other proteinase inhibitors from *Streptomyces*, *Biochim Biophys Acta.* **1292**, 233-40.
191. Kajiwar, K., Fujita, A., Tsuyuki, H., Kumazaki, T. & Ishii, S. (1991) Interactions of *Streptomyces* serine-protease inhibitors with *Streptomyces griseus* metalloendopeptidase II, *J Biochem.* **110**, 350-4.
192. Tanabe, M., Asano, T., Moriya, N., Sugino, H. & Kakinuma, A. (1994) Isolation and characterization of *Streptoverticillium* anticoagulant (SAC), a novel protein inhibitor of blood coagulation produced by *Streptoverticillium cinnamomeum* subsp. *cinnamomeum*, *J Biochem.* **115**, 743-51.
193. Akasaka, K. (1985) H n.m.r. spectrum from the flexible N-terminal segment of *Streptomyces* subtilisin inhibitor, *Int J Pept Protein Res.* **25**, 547-53.
194. Umezawa, H. (1982) Low-molecular-weight enzyme inhibitors of microbial origin, *Annu Rev Microbiol.* **36**, 75-99.
195. Aoyagi, T., Miyata, S., Nanbo, M., Kojima, F. & Matsuzaki, M. (1969) Biological activities of leupeptins, *J Antibiot (Tokyo).* **22**, 558-68.
196. Galpin, I. J., Wilby, A. H., Place, G. A. & Beynon, R. J. (1984) Synthetic analogues of the proteinase inhibitor: chymostatin, *Int J Pept Protein Res.* **23**, 477-86.
197. Kondo, S. I., Kawamura, K., Iwanaga, J., Hamada, M. & Aoyagi, T. (1969) Isolation and characterization of leupeptins produced by *Actinomycetes*, *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **17**, 1896-901.

-
198. Umezawa, H., Aoyagi, T., Okura, A., Morishima, H. & Takeuchi, T. (1973) Letter: Elastatinal, a new elastase inhibitor produced by actinomycetes, *J Antibiot (Tokyo)*. **26**, 787-9.
199. Tatsuta, K., Mikami, N., Fujimoto, K., Umezawa, S. & Umezawa, H. (1973) The structure of chymostatin, a chymotrypsin inhibitor, *J Antibiot (Tokyo)*. **26**, 625-46.
200. T. Shin-Watanabe, K. F., S. Murao (1982) The structure of β -MAPI, a novel proteinase inhibitor, *Tetrahedron*. **38**, 1775-1780.
201. Kuramochi, H., Nakata, H. & Ishii, S. (1979) Mechanism of association of a specific aldehyde inhibitor, leupeptin, with bovine trypsin, *J Biochem*. **86**, 1403-10.
202. Tomkinson, N. P., Galpin, I. J. & Beynon, R. J. (1992) Synthetic analogues of chymostatin. Inhibition of chymotrypsin and *Streptomyces griseus* proteinase A, *Biochem J*. **286** (Pt 2), 475-80.
203. Delbaere, L. T. & Brayer, G. D. (1980) Structure of the complex formed between the bacterial-produced inhibitor chymostatin and the serine enzyme *Streptomyces griseus* protease A, *J Mol Biol*. **139**, 45-51.
204. Delbaere, L. T. & Brayer, G. D. (1985) The 1.8 Å structure of the complex between chymostatin and *Streptomyces griseus* protease A. A model for serine protease catalytic tetrahedral intermediates, *J Mol Biol*. **183**, 89-103.
205. Gorenstein, D. G. & Shah, D. O. (1982) Proton and fluorine nuclear magnetic resonance spectroscopic observation of hemiacetal formation between N-acyl-p-fluorophenylalaninals and α -chymotrypsin, *Biochemistry*. **21**, 4679-86.
206. Sabotic, J. & Kos, J. (2012) Microbial and fungal protease inhibitors--current and potential applications, *Appl Microbiol Biotechnol*. **93**, 1351-75.
207. Nishikata, M. (1983) Affinity chromatography of chymotrypsin on a sepharose derivative coupled with a chymostatin analogue, *J Biochem*. **93**, 73-9.
208. Grinde, B., Galpin, I. J., Wilby, A. H. & Beynon, R. J. (1983) Inhibition of hepatic protein degradation by synthetic analogues of chymostatin, *J Biol Chem*. **258**, 10821-3.
209. Mulligan, M. T., Galpin, I. J., Wilby, A. H. & Beynon, R. J. (1985) The effect of synthetic analogues of chymostatin upon protein degradation in isolated skeletal muscle, *Biochem J*. **229**, 491-7.
210. Place, G. A., Chetland, J., Galpin, I. J. & Beynon, R. J. (1987) The effect of analogues of chymostatin on lysosomal and non-lysosomal components of protein degradation in isolated hepatocytes, *Biochim Biophys Acta*. **925**, 185-93.
211. Hopgood, M. F., Knowles, S. E. & Ballard, F. J. (1989) Proteolysis of N-ethylmaleimide-modified aldolase loaded into erythrocyte ghosts: prevention by inhibitors of calpain, *Biochem J*. **259**, 237-42.
212. Hanada, K. T., M.; Yamagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I. (1978) Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor, *Agricultural and Biological Chemistry*. **42**, 523-528.
213. Frlan, R. & Gobec, S. (2006) Inhibitors of cathepsin B, *Curr Med Chem*. **13**, 2309-27.

-
214. Johansson, N., Ahonen, M. & Kahari, V. M. (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion, *Cell Mol Life Sci.* **57**, 5-15.
215. Lah, T. T., Duran Alonso, M. B. & Van Noorden, C. J. (2006) Antiprotease therapy in cancer: hot or not?, *Expert Opin Biol Ther.* **6**, 257-79.
216. Abbenante, G. & Fairlie, D. P. (2005) Protease inhibitors in the clinic, *Med Chem.* **1**, 71-104.
217. Ulisse, S., Baldini, E., Sorrenti, S. & D'Armiento, M. (2009) The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy, *Curr Cancer Drug Targets.* **9**, 32-71.
218. Vaccari, M., Argnani, A., Horn, W., Silingardi, P., Giungi, M., Mascolo, M. G., Bartoli, S., Grilli, S. & Colacci, A. (1999) Effects of the protease inhibitor antipain on cell malignant transformation, *Anticancer Res.* **19**, 589-96.
219. Hozumi, M., Ogawa, M., Sugimura, T., Takeuchi, T. & Umezawa, H. (1972) Inhibition of tumorigenesis in mouse skin by leupeptin, a protease inhibitor from Actinomycetes, *Cancer Res.* **32**, 1725-8.
220. H., J. (2017) Inhibition and attenuation of pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* by leupeptin: A review, *Frontiers in Biology.* **12**, 192-198.
221. Houle, M. A., Grenier, D., Plamondon, P. & Nakayama, K. (2003) The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain, *FEMS Microbiol Lett.* **221**, 181-5.
222. Mao, Y., Varoglu, M. & Sherman, D. H. (1999) Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564, *Chem Biol.* **6**, 251-63.
223. Batra, J., Szabo, A., Caulfield, T. R., Soares, A. S., Sahin-Toth, M. & Radisky, E. S. (2013) Long-range electrostatic complementarity governs substrate recognition by human chymotrypsin C, a key regulator of digestive enzyme activation, *J Biol Chem.* **288**, 9848-59.
224. Pinkas, D. M., Strop, P., Brunger, A. T. & Khosla, C. (2007) Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation, *PLoS Biol.* **5**, e327.
225. Stieler, M., Weber, J., Hils, M., Kolb, P., Heine, A., Buchold, C., Pasternack, R. & Klebe, G. (2013) Structure of active coagulation factor XIII triggered by calcium binding: basis for the design of next-generation anticoagulants, *Angew Chem Int Ed Engl.* **52**, 11930-4.

6. Anhang

6.1. Zusätzliche Abbildungen

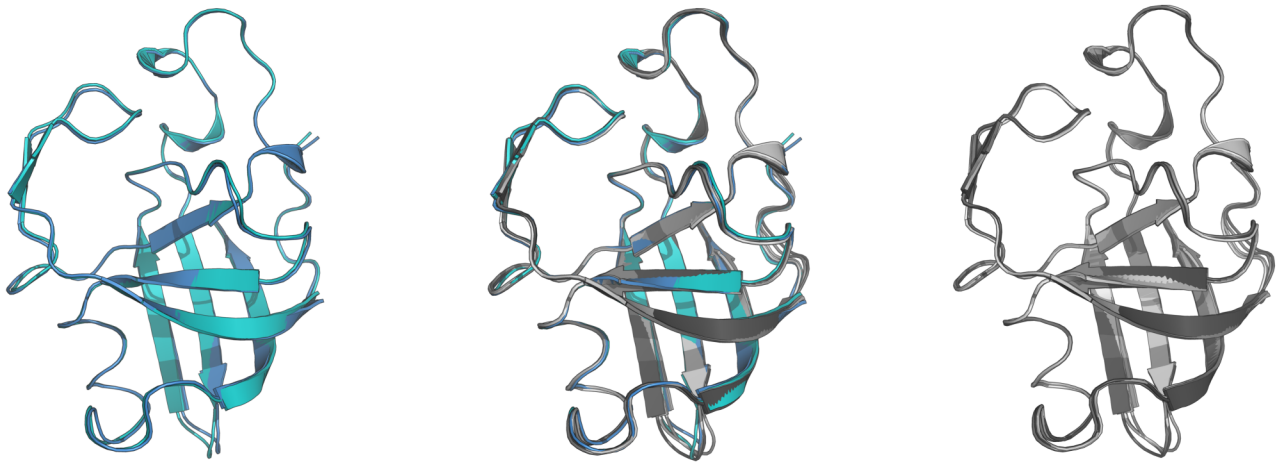


Abbildung 62: Vergleich der Kristallstrukturen von *Sm-SPI_p* und *rSPI_p* aus *E. coli*.

Links, Kette A und B von *Sm-SPI_p*; Mitte, *Sm-SPI_p* und *rSPI_p*; rechts, Ketten A-D von *rSPI_p*. Die Strukturen von *Sm-SPI_p* und *rSPI_p* sind mit einer RMSD (Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung) von 0.30 – 0.38 Å nahezu identisch.

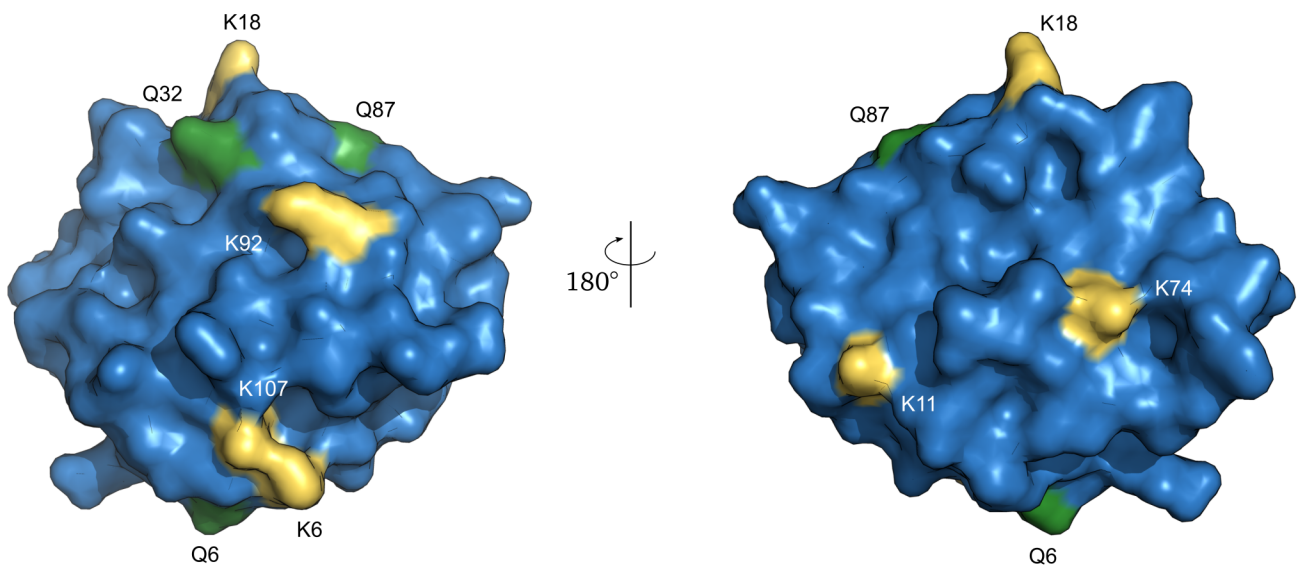


Abbildung 63: Oberflächendarstellung des *SPI_p*.

Die Position der Glutamine ist in grün und die Lysine in gelb hervorgehoben.

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sporulation und des Lebenszyklus von Actinomyceten.	2
Abbildung 2: Transglutaminase katalysierte Reaktionen.....	4
Abbildung 3: Darstellung der Primärstruktur der Präprotransglutaminase von <i>S. mobaraensis</i>	5
Abbildung 4: Die Aminosäuresequenz der MTG von <i>S. mobaraensis</i> an der Bindestelle von Proteasen.	7
Abbildung 5: Prozessierung der Transglutaminase von <i>S. mobaraensis</i>	7
Abbildung 6: Kristallstruktur der mikrobiellen Transglutaminase (PDB: 3IUO).....	8
Abbildung 7: Oberflächenbeschaffenheit der mikrobiellen Transglutaminase (PDB: 1IU4).....	9
Abbildung 8: Hypothetischer Katalysemechanismus der mikrobiellen Transglutaminase.	10
Abbildung 9: Biotinylierte TGase-Substrate für die Identifizierung von MTG-Bindestellen.	12
Abbildung 10: Kristallstruktur des DAIP (PDB: 5FZP).	15
Abbildung 11: Aufbau eines Protein-Blots.....	53
Abbildung 12: Klonierungsstrategie für das SPI _{opt} -Gen in pET22b(+).	57
Abbildung 13: Expressionsvektoren für die rek. Produktion von SSTI und TAMP in <i>E. coli</i>	58
Abbildung 14: Chromatogramm und SDS-PAGE der Anreicherung von rTAMP durch IMAC.....	60
Abbildung 15: Chromatogramm und SDS-PAGE der IAC von rTAMP.....	61
Abbildung 16: Chromatogramm und SDS-PAGE der GPC von rTAMP.....	62
Abbildung 17: Identifizierung der katalytischen rTAMP durch SDS-PAGE.	63
Abbildung 18: Primärsequenz von rTAMP produziert in <i>E.coli</i>	64
Abbildung 19: pH- und Temperaturoptimum von rTAMP.	65
Abbildung 20: Michaelis-Menten-Kinetik und EDTA-Inhibierung von rTAMP.	66
Abbildung 21: Affinität von rTAMP zu rproMTG.	67
Abbildung 22: Chromatogramm und SDS-PAGE der IAC von rSSTI.	69
Abbildung 23: Chromatogramm und SDS-PAGE der GPC von rSSTI.	70
Abbildung 24: Komplexbildung von rTAMP und rSSTI angezeigt durch analytische GPC.	71
Abbildung 25: ITC und Inhibierung von rTAMP mit rSSTI.	72
Abbildung 26: Sequenzvergleich von <i>Streptomyces</i> -Subtilisin-Inhibitoren.	73
Abbildung 27: ITC und Inhibierung von rTAMP mit N-terminal modifizierten rSSTI-Varianten.	76
Abbildung 28: Biotinylierung N-terminal verlängerter rSSTI-Varianten mit Transglutaminase.....	79
Abbildung 29: Chromatogramm und SDS-PAGE der IAC von Sm-SPI.	80
Abbildung 30: Chromatogramm und SDS-PAGE der GPC von Sm-SPI.	81
Abbildung 31: Massenspektrometrische Analyse von Sm-SPI nach verschiedenen Reinigungsstufen.	82
Abbildung 32: Basislinientrennung von Sm-SPI _p und SPI _{ac} mittels IAC.	83
Abbildung 33: Chromatogramm der IAC von SPI _{ac}	86
Abbildung 34: Trennung von SPI _{ac} durch Kieselgel-60-Chromatographie.	87
Abbildung 35: Präparative C ₁₈ -HPLC von SPI _{ac} nach Kieselgel-60-Chromatographie.	88
Abbildung 36: Massenspektrometrische Analyse der SPI _{ac} -Isolate nach präp. HPLC.....	90
Abbildung 37: Strukturen von Antipain-Derivaten als Muster zur Bestimmung der SPI _{ac} -Struktur.	91
Abbildung 38: Struktur von AC1.1 und AC2.3.....	92
Abbildung 39: MS-MS Analyse von SPI _{ac} -Isolaten.	94

Abbildung 40: Struktur von Chymostatin B und Leupeptin.	95
Abbildung 41: Mechanismus der Peptidaldehyd-Inhibierung von Serin- und Cysteinproteasen.	96
Abbildung 42: Kristallstruktur des Papain-AC2 Komplexes.....	98
Abbildung 43: IC ₅₀ -Bestimmung der SPI _{ac} -Isolate mit Papain und Chymotrypsin.	100
Abbildung 44: MS-Untersuchung von Holo-SPI aus dem Kulturüberstand von <i>S. mobaraensis</i>	101
Abbildung 45: Chromatogramm und SDS-PAGE der IAC von rSPI.....	103
Abbildung 46: Chromatogramm und SDS-PAGE der GPC von rSPI.....	104
Abbildung 47: Sequenzvergleich von SPI _p mit putativen <i>Streptomyces</i> -Proteinen.....	105
Abbildung 48: Kristallstruktur des SPI _p und Strukturvergleich mit DPBB-beinhaltenden Proteinen [157].....	107
Abbildung 49: Seitenketten-Interaktionen der Glutamine des SPI _p [157].	110
Abbildung 50: Detektion der Glutaminbindestellen am SPI _p mit MTG-vermittelter Biotinylierung [157].	111
Abbildung 51: MTG-vermittelte Biotinylierung von rSPI _p -Varianten im Vergleich mit rDAIP [157].	112
Abbildung 52: Protein-Protein- <i>Docking</i> der Transglutaminase mit dem Homologie-Modell des SPI _p	114
Abbildung 53: Zusammenfassung der Mutagenesestudie des SPI _p [157].....	115
Abbildung 54: Hemmung der mikrobiellen Transglutaminase durch chloracetylierte Serinpeptide [173].	117
Abbildung 55: Kinetik der Transglutaminase-Hemmung durch IP1, IP2 und IP3 [173].....	118
Abbildung 56: Kristallstruktur von DIPIGS-(COCH ₂ Cl)-KMTG-NH ₂ (IP2) kovalent an MTG gebunden [173].....	120
Abbildung 57: Analyse der N-terminalen Region von SPI _p auf Grundlage des an MTG gebundenem IP2 [173]....	122
Abbildung 58: Modell eines potentiellen SPI _p -MTG-Komplexes [173].	123
Abbildung 59: Modell für die MTG-vermittelte Vernetzung und Proteinmodifikation [173].....	124
Abbildung 60: Transglutaminase-aktivierende Metalloproteasen von Streptomyceten.....	127
Abbildung 61: SSTI und verwandte Proteine von Streptomyceten.	131
Abbildung 62: Vergleich der Kristallstrukturen von Sm-SPI _p und rSPI _p aus <i>E. coli</i>	156
Abbildung 63: Oberflächendarstellung des SPI _p	156

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung einer PCR.....	32
Tabelle 2: Programm einer PCR für die Amplifikation von Genen	32
Tabelle 3: IAC-Säulen- und Pufferbedingungen	37
Tabelle 4: Pufferbedingungen für die GPC	37
Tabelle 5: Aufbau der präparativen HPLC	41
Tabelle 6: Zusammensetzung eines 12.5 bzw. 15%igen SDS-Gel.....	43
Tabelle 7: Bedingungen der Schmelzpunktbestimmung von Proteinen.....	45
Tabelle 8: Standard-Bedingungen der ITC.....	46
Tabelle 9: Assaybedingungen des Aminomethylcoumarin-Tests	49
Tabelle 10: Proteaselösungen für den Anson-Test	51
Tabelle 11: Aufbau der analytischen HPLC ESI-MS	54
Tabelle 12: Inhibierung von TAMP und Subtilisin durch SSTI-Varianten.....	75
Tabelle 13: Thermodynamische Parameter <i>N</i> -terminal veränderter <i>r</i> SSTI-Varianten.....	77
Tabelle 14: SPI _{ac} -Bindekapazität verschiedener Säulenmaterialien.....	84
Tabelle 15: NMR-Daten AC1.1 und AC2.3.	92
Tabelle 16: Schmelzpunktbestimmung von Papain und Cymotrypsin in Gegenwart von SPI _{ac}	99
Tabelle 17: Schmelzpunkte und rel. Biotinylierung von <i>r</i> SPI _p -Varianten.....	109
Tabelle 18: Glutamine-flankierende Sequenzen der intrinsischen MTG-Substrate DAIP und SPI _p	117

6.4. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
DAIP	Dispase-Autolyse-induzierendes Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Gl.	Gleichung
GPC	Gelpermeationschromatographie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
His-Tag	Polyhistidin-Tag
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IAC	Ionenaustauschchromatographie
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IEF	isoelektrische Fokussierung
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MTG	mikrobielle Transglutaminase
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDB	Proteindatenbank
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAC	<i>Streptomyces</i> -Antikoagulanzen
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOE	<i>size overlap extension</i>
SPI	<i>Streptomyces</i> -Papain-Inhibitor
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SSI	<i>Streptomyces</i> -Subtilisin-Inhibitor
SSTI	<i>Streptomyces</i> -Subtilisin- und TAMP-Inhibitor
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TAMP	Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGase	Transglutaminase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	verglichen
wt	Wildtyp
WW	Wechselwirkungen

7. Danksagung

Nach Jahren der intensiven Arbeit ist es nun an der Zeit mich bei all den Menschen zu bedanken, die mir diese Promotion ermöglichten und mich bei deren Anfertigung auf allen Ebenen unterstützten.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer, für die Bereitstellung des interessanten Themas, dem entgegengebrachten Vertrauen, die exzellente Betreuung und viele anregende und motivierende Gespräche.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer bedanken, die mir die Möglichkeit der Promotion eröffnete und für die Übernahme des Referates.

Ohne die hervorragende Zusammenarbeit mit engagierten Kooperationspartnern wären viele Ergebnisse dieser Arbeit sowie Publikationen nicht möglich gewesen, daher gilt mein Dank:

Dr. Andrea Scrima und Dr. Stefan Schmelz vom Helmholtz Institut für Infektionsforschung in Braunschweig, für die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des SPI_p, SSTI und MTG-Inhibitor-Komplexes, sowie die dadurch ermöglichten und gemeinschaftlich erstellten Veröffentlichungen.

Prof. Dr. Stefan Knapp und Dr. Andreas Krämer vom Institut für pharmazeutische Chemie der Goethe Universität Frankfurt, für die Unterstützung bei der strukturellen Untersuchung des MTG-Inhibitor-Komplexes sowie die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der SPI_{ac}-Papain-Komplexe.

Dr. John Hays und Dr. Wendy Kaman vom Erasmus University Medical Centre in Rotterdam für das Ermöglichen meines Forschungsaufenthalts in Rotterdam und die damit verbundenen Erfahrungen.

Prof. Dr. Harald Kolmar und seiner Arbeitsgruppe Biochemie danke ich für die Unterstützung in zahlreichen Projekten und die Bereitstellung seiner Laboratorien.

Prof. Dr. Reinhard Meusinger danke ich für die Durchführung und Auswertung der NMR-Messungen für die Strukturaufklärung des SPI_{ac}.

Prof. Dr. Stefan Hüttenhain danke ich für seine motivierenden Worte und Ratschläge für die Reinigung des SPI_{ac}.

Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes danke ich für seine freundliche und offene Art, sowie seine Hilfe bei physikochemischen Fragestellungen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Graduiertenschule der Hochschule Darmstadt und Frau Dr. Janina Fengel für die Bereitstellung eines Promotionsstipendiums bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Fuchsbauer und Meyer-Almes für das freundliche und sehr angenehme Arbeitsklima besonders bei den Laboringenieuren Ulrike Becher und Michael Schröder, meinen Kollegen Anita Anderl, David Fiebig, Benjamin Wolff, Christian Meyners, Niklas Jänsch und Alexander Kleinschek sowie meinen Bacheloranden Jan Bogen, Annabel Sperling, Luisa Lauer, Sascha Hoffman, Tobias Bauer, Moritz Claßen und Masterand Felix Colin bedanken.

Ein Dankeschön gehört meiner Freundin und meinen engen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Hannelore und Egon, die mich auf allen meinen Wegen stets begleitet und unterstützt haben. Mit ihrem immer währenden Rückhalt ermöglichten sie mir mein Leben uneingeschränkt zu gestalten.

8. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

.....

(Norbert Egon Jüttner)

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Norbert Egon Jüttner
Geburtsdaten: 04. August 1984 in Görlitz

PROMOTION

Seit 04/2015 **Dissertation zum Dr. rer. nat.,**
Fachbereich: Biologie, Technische Universität Darmstadt
Erstgutachterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer
Thema:
„Struktur und Funktion von Proteasen und Proteaseinhibitoren des
Transglutaminaseproduzenten *Streptomyces mobaraensis*“

STUDIUM

03/2008 – 08/2008 **Diplomarbeit** bei der Zedira GmbH in Darmstadt,
Hochschule Darmstadt, University of Applied Science
Fachbereich: Chemie- und Biotechnologie,
Betreuer: Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer
Thema:
„Entwicklung von Screening-Verfahren zur Selektion von ConA-
Mutanten hinsichtlich der Bindungsaktivität gegenüber Glucose.“

09/2004 – 08/2008 **Studiengang Biotechnologie (Diplom),**
Hochschule Darmstadt, University of Applied Science
(Abschlussnote: sehr gut, 1,1)
Titel:
„Diplom-Ingenieur für Biotechnologie (FH)“

SCHULBILDUNG

07/1995 – 07/2003 **Gymnasium Augustum Görlitz**

08/1991 – 06/1995 **Grundschule Ludwigsdorf**

Wehr-/Zivildienst

08/2003 – 05/2004 **Zivildienst** im Klinikum Görlitz

BERUFSERFAHRUNG

03/2012 – 03/2015 **Associate Scientist bei der Sandoz GmbH, Abteilung
Downstream Process Development, Kundl Österreich**

04/2010 – 02/2012 **Research Associate bei der Proteros biostructures GmbH,
Martinsried**

09/2008 – 03/2010 **Labor-Ingenieur bei der Zedira GmbH, Darmstadt**

.....

(Norbert Egon Jüttner)

10. Daten DVD

Im Einband dieser Arbeit.

Beinhaltet:

- Expressionsvektoren
- MS-Daten
- NMR-Daten
- PDB-Strukturen
- Veröffentlichungen